

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kateřina Marcollová

Úloha růstových faktorů a cytokinů v regulaci meiotického zrání oocytů savců

The role of growth factors and cytokines in regulation of mammalian oocyte maturation

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MVDr. Radek Procházka, CSc.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i.

Laboratoř vývojové biologie

Praha, 2020

Děkuji svému školiteli MVDr. Radkovi Procházkovi, CSc. za odborné konzultace, pohotovost, a především za trpělivost. Zároveň děkuji své rodině za podporu během celého studia.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha

Podpis

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Struktura ovariálního folikulu.....	2
3	I. meiotický blok	5
3.1	Role folikulárních buněk	5
3.2	Cyklický AMP a jeho vliv na zastavení meiotického dělení.....	5
3.3	Funkce receptorů spřažených s G proteinem.....	6
3.4	Dráhy spouštěné cAMP při meiotickém arestu	6
3.5	Udržení oocytů v I. meiotickém bloku	7
3.6	Tvorba cGMP granulózními buňkami	9
4	Znovuobnovení meiotického dělení.....	11
4.1	Gonadotropiny a faktory podobné EGF	11
4.2	EGFR receptor	13
4.3	Zvýšení cAMP po stimulaci LH	15
4.4	MAPK dráha	15
4.5	Snížení propustnosti mezerových spojů	17
4.6	CNP, aktivita NPR2 a následné snížení cGMP	18
4.7	Fosfodiesterázy	18
4.8	Další procesy spouštěné při obnově meiotického dělení.....	19
5	Růstové faktory	22
5.1	FGF10.....	22
5.2	FGF2.....	23
5.3	IGF-1.....	23
5.4	LIF	24
6	Kultivační médium „FLI“	26
7	Závěr	27
8	Použitá literatura	28

Abstrakt

Rozmnožování je klíčové pro přežití druhu. Oocyty jsou ve folikulu blokovány v profázi I. meiotického dělení. Stimulací gonadotropiny folikul roste a oocyt získává kompetence. Vyloučení 1. polárního tělíska je znak obnovy dělení oocyty. V profázi I. je oocyt blokován vysokou hladinou cAMP, aktivující PKA, která fosforylací inhibuje MPF. NPR2 po vazbě CNP tvoří v granulózních buňkách cGMP, který difunduje do oocyty, kde inhibičně kompetuje s cAMP na PDE3A, čímž je udržován dostatek cAMP pro blokaci oocyty v profázi. LH a FSH vyplavené z hypofýzy spouští signální kaskádu, obnovující meiotické dělení. Syntézou AREG, EREG a BTC v somatických buňkách se aktivují EGFR a MAPK dráhy, které se podílí na snížení propustnosti mezerových spojů a snížení aktivity NPR2, čímž poklesne produkce i transport cGMP. Do oocyty difunduje méně cGMP a aktivuje se PDE3A, hydrolyzující cAMP, díky čemuž se aktivuje MPF a obnoví se meiotické dělení. MAPK spolu s PI3K také zvyšují expresi *Has2* a tím i produkci kyseliny hyaluronové, podílející se na expanzi kumulárních buněk a ovulaci oocyty. Využitím *in vitro* technik a kultivací oocytů s růstovými faktory a cytokiny, se zlepšuje zrání a růst oocytů, které vede ke kvalitnějším blastocystám. Médium FLI, kombinující FGF2, LIF a IGF-1, zvyšuje úspěšnost kultivace oocytů a kvalitu blastocyst u hospodářských zvířat. Médium FLI představuje perspektivu pro *in vitro* kultivaci a fertilizaci i v humánní medicíně.

Klíčová slova: oocyt, znovuzahájení meiózy, růstové faktory, cytokiny, signální dráhy

Abstract

Reproduction is key for species survival. Oocytes are blocked in prophase I of meiosis in follicle. Gonadotropin stimulation leads to follicle growth and competent oocyte. First polar body extrusion is a sign of meiotic division resumption. Oocyte is blocked at prophase I by a high cAMP level, activating PKA, that inhibits MPF. CNP binds to NPR2, that stimulates the generation of cGMP in granulosa cells, which diffuses to oocyte where it competes with cAMP on PDE3A. LH and FSH released from pituitary gland initiates signaling cascade restoring meiotic division. Synthesis of AREG, EREG and BTC activates EGFR and MAPK pathways in somatic cells which contribute to reduction of gap junction permeability, lowering NPR2 activity, that leads to reduction of cGMP production and transport. Less cGMP diffuses to oocytes, which leads to PDE3A activation and cAMP hydrolysis. This causes MPF activation and meiotic division resumption. MAPK together with PI3K participate on increasing production of hyaluronic acid, thereby cumulus cells expansion and oocyte ovulation. Oocyte maturation and growth is improved with utilization of *in vitro* technics and oocyte cultivation with growth factors and cytokines. FLI medium, combining FGF2, LIF and IGF-1, increases oocyte cultivation success and blastocyst quality of farm animals. FLI medium represents a perspective in *in vitro* cultivation and fertilization also in human medicine.

Key words: oocyte, meiosis resumption, growth factors, cytokines, signaling pathways

Seznam zkratek

ADAM	<i>a disintegrin and metallopeptidase 17</i>	
AKT		proteinkináza B (synon. PKB)
ANP	atrial natriuretic peptide	atriální natriuretický peptid
AREG	amphiregulin	amfiregulin
ATP	adenosin trisphosphate	adenosit trifosfát
BNP	B-type natriuretic peptide	natriuretický peptid typu B
BTC	betacellulin	betacelulin
cAMP	cyclic adenosin monophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
CDC25	<i>cell division cycle</i> phosphatase 25	fosfatáza CDC25
Cdk	cyklin-dependent kinase	cyklin-dependentní kináza
cGMP	cyclic guanosin monophosphate	cyklický guanosinmonofosfát
CNP	C-type natriuretic peptide	natriuretický peptid C
EGF	epidermal growth factor	epidermální růstový faktor
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor epiderm. růstového faktoru
ErbB		synonymum EGFR
FGF	fibroblast growth factor	fibroblastový růstový faktor
FGFR	fibroblast growth factor receptor	receptor pro fibroblas. růstový faktor
FSH	follicle-stimulating hormone	folikuly stimulující hormon
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>	
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>	
gp130	glycoprotein 130	glykoprotein 130
GPCR	G protein-coupled receptor	receptor spřažený s G proteinem
GPR		synonymum GPCR
GVBD	germinal vesicle breakdown	rozpad zárodečného vaku
Has2	hyaluronan synthase 2	hyaluronan syntáza 2
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>	
hCG	human chorionic gonadotropin	choriový gonadotropin
IGF	insulin-like growth factor	inzulinu podobný růstový faktor
IGF-1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>	
LH	luteinizing hormone	luteinizační hormon
LHR	luteinizing hormon receptor	receptor pro luteinizační hormon
LIF	leukemia inhibitory factor	faktor bránící leukemii

LIFR	leukemia inhibitory factor receptor	receptor pro faktor bránící leukemii
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogenem aktivované proteinkinázy
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K)</i>	
Mos	<i>proto-oncogene serine/threonine-protein kinase mos</i>	
MPF	maturation-promoting factor	faktor podporující zrání
mRNA	messenger ribonucleic acid	messengerová ribonukleová kyselina
Nppb	natriuretic peptide precursor B	prekurzor pro natriuretický peptid B
Nppc	natriuretic peptide precursor C	prekurzor pro natriuretický peptid C
NPR2	guanylate cyclase B	guanylát cykláza B
OHSS	ovarian hyperstimulation syndrome	ovariální hyperstimulační syndrom
PCOS	polycystic ovary syndrome	syndrom polycystických ovarií
PDE	phosphodiesterase	fosfodiesteráza
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	protein kinase A	protein kináza A
PKB	protein kinase B	protein kináza B
PKC	protein kinase C	protein kináza C
PLC	phospholipase C	fosfolipáza C
PMSG	<i>pregnant mare's serum gonadotropin</i>	
Ptgs2	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>	
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma kinase</i>	
RAS	<i>rat sarcoma small GTPase</i>	
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>	
Ser	serine	serin
SRC	<i>proto-oncogene tyrosine – protein kinase Src</i>	
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>	
TGF	transforming growth factor	transformující růstový faktor
Thr	threonine	threonin
Tyr	tyrosine	tyrosin
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulární endotelový růstový faktor

1 Úvod

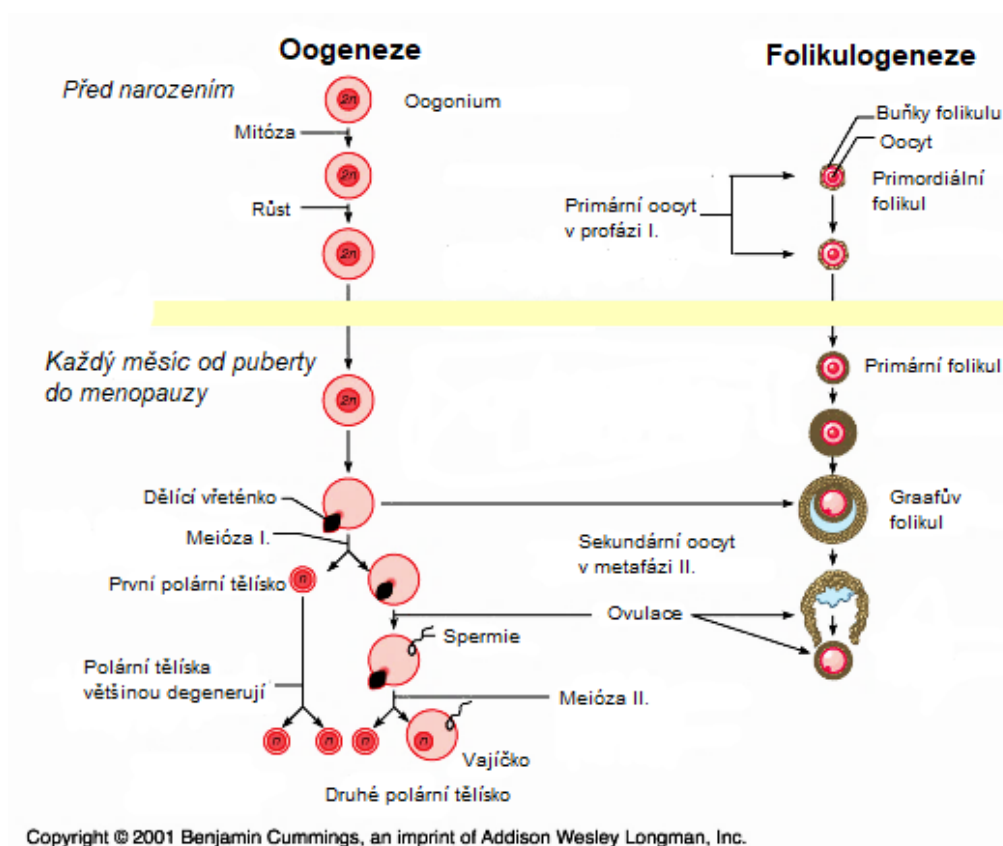
Rozmnožování je jedna z důležitých potřeb pro přežití druhu. Vaječníky jako součást samičího reprodukčního traktu díky mnoha buněčným typům vytvářejí prostředí, ve kterém se ve folikulu nacházejí oocyty v I. meiotickém bloku. Po dosažení pohlavní dospělosti dochází pravidelně pod vlivem gonadotropinů k růstu a zvětšování folikulu, tvorbě antra a k dokončení prvního meiotického dělení oocyty.

Na udržení oocyty v I. meiotickém bloku se podílejí různé molekuly a různé signální dráhy. Pochopením těchto molekulárních drah a mechanismů, které iniciují gonadotropiny, by se mohlo dosáhnout lepší úspěšnosti při asistované reprodukci. Využití definovaných kultivačních médií, obohacených o růstové faktory a cytokiny, by mohlo zlepšit *in vitro* kultivaci a fertilizaci, a tím zvýšit úspěšnost asistované reprodukce u hospodářských zvířat.

Cílem této práce je popis struktury folikulu a jeho vývoje v kontextu oogeneze. Dále se práce zaměřuje na mechanismy udržující oocyt v profázi I během meiotického vývoje a následné signální dráhy a na molekuly, které se podílejí na obnově meiotického dělení po dosažení reprodukčního věku. Podrobněji se tato práce zaměřuje na vybrané růstové faktory a cytokiny, jejichž kombinací je možné vytvořit médium s vylepšenými kultivačními vlastnostmi.

2 Struktura ovariálního folikulu

Vaječníky představují jednu z částí samičího reprodukčního ústrojí. Obsahují velké množství ovariálních folikulů různých velikostí. Vývoj a tvorba zásoby tzv. primordiálních folikulů probíhá již během embryonálního vývoje. Oocyt nacházející se v nejmenším, primordiálním, folikulu je pozastaven v profázi meiózy I. Primordiální folikul obklopuje jedna vrstva granulózních buněk. V periodicky se opakujících cyklech část oocytů dozrává a většinou dochází k ovulaci jednoho nebo více oocytů. Preantrální neboli primární folikul obsahuje oocyt obklopený narůstajícím počtem granulózních buněk. Dalším fenotypově odlišným stádiem je antrální neboli sekundární folikul, jehož významným znakem je tvorba antra, které je vyplněné folikulární tekutinou. Okolo oocytu v tomto stádiu vzniká glykoproteinový obal známý jako *zona pellucida* (*Zhao & Dean, 2002). Největší antrální folikul se nazývá preovulační, někdy též označovaný jako Graafův folikul. Jedná se o nejvíce vaskularizovaný folikul, k jehož zvětšení došlo po příjmu velkého množství gonadotropinů. Graafův folikul je tvořen několika vrstvami kumulárních buněk okolo oocytu, který je částí v kontaktu s *membrana granulosa*, ta je tvořena přibližně 5-10 vrstvami buněk. Vnější vrstvy granulózních buněk vytvářejí pseudostratifikovaný epitel tvořící bazální laminu. Thekální buňky vně bazální laminy vytvářejí komunikační spojku, která je cévně zásobená. Folikuly stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH) vyloučené z adenohypofýzy přecházejí krví přímo k thekálním buňkám a dále stimulují vývoj folikulu. Ovariální folikuly představují důležité místo tvorby steroidních molekul, které jsou následně upraveny na estrogen v granulózních buňkách a stimulují vývoj folikulu (*Rimon-Dahari *et al.*, 2016; *Sarma *et al.*, 2019).



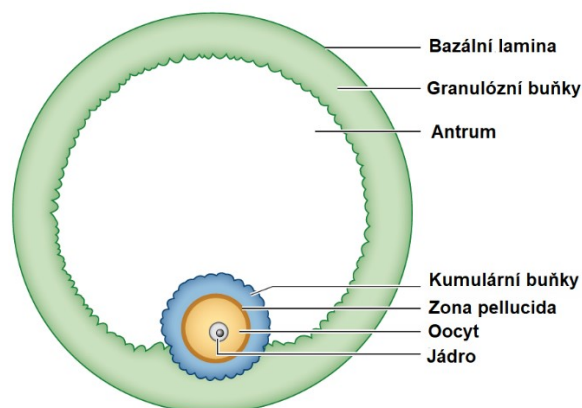
Obr. 1 Oogeneze v kontextu folikulogeneze. Převzato a upraveno z

<https://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes2%20female%20reproduction.htm>

Komplexní struktura thekálních, granulózních a kumulárních buněk je propojena s oocytem pomocí mezerových spojů v jedno syncytium (Norris *et al.*, 2008). Mezerové spoje jsou typy mezibuněčných spojení, kdy hexamerní proteiny zvané konexiny tvoří kanálky, kterými mohou procházet malé molekuly. Na rozhraní oocytu a granulózních buněk se majoritně vyskytuje homomerní konexin 37 (Simon *et al.*, 1997; Veitch, 2004). Mezi granulózními buňkami v dalších částech folikulu se nachází především konexin 43 (Norris *et al.*, 2008).

Velikost folikulů je druhově specifická a liší se i v rámci vývojového stádia folikulu. Myši preovulační folikul měří přibližně 400 μm , lidský preovulační folikul měří až 2 cm. S rostoucí velikostí těla savce pravděpodobně roste i nárok na vyšší koncentraci estrogenu, který je produkován buňkami folikulu. Ovšem zvětšování folikulu se děje především objemovým zvětšováním antra (Bächler *et al.*, 2014). Na rozdíl od toho se velikost oocytů

pohybuje v poměrně jednotném rozmezí napříč druhy, a to přibližně od 70 μm u hlodavců do 120 μm u člověka nebo u skotu (*van den Hurk & Zhao, 2005).



Obr. 2 Struktura savčího preovulačního folikulu. Oocyt v profázi I je obklopen vrstvou kumulárních buněk, která částečně komunikuje s vrstvou granulózních buněk. Antrum vyplněné folikulární tekutinou odděluje somatické buňky. Převzato z Jaffe & Egbert (2017) a upraveno.

Meiotické dělení má za cíl redukci chromozomální sady v gametách — z diploidní sady na haploidní. Meióza probíhá ve dvou děleních. V profázi I dojde k duplikaci chromozomů, tvorbě tetrad a formaci synaptonemálního komplexu. Následně proběhne crossing-over mezi homologními chromozomy. Ve fázi diplotene dochází k rozvolnění synaptonemálního komplexu a chromozomy se začínají separovat, nicméně stále zůstávají spojeny chiasmaty. V této fázi se oocyt nachází od fetálního vývoje až do puberty, popřípadě u lidí až do nástupu menopauzy. Oocyt zastavený v profázi I obsahuje velké jádro, také nazývané zárodečný váček. Jakmile přijde vlna LH, dojde k rozvolnění jaderného obalu, obnoví se meiotické dělení a první fáze meiózy končí tvorbou prvního polárního tělíska, ve kterém se nachází jedna sada chromozomů. Sekundární oocyt následně pokračuje v meiotickém dělení až do tvorby druhého dělicího vřeténka. Ve stádiu metafáze II dochází k ovulaci oocytu. Obnova a dokončení meiotického dělení nastane až pokud dojde k oplození oocytu spermií, poté se teprve vyloučí druhé polární tělísko. Tímto mechanismem se v oocytu získá haploidní sada chromozomů. Splynutí haploidního chromozomu oocytu a spermie dá vznik novému jedinci s diploidní chromozomální sadou. (*Bukovsky *et al.*, 2005; *Cohen *et al.*, 2006; *Pepling, 2006; *Baudat *et al.*, 2013)

3 I. meiotický blok

3.1 Role folikulárních buněk

Oocyt nacházející se v primordiálním nebo primárním folikulu nemá sám dostatečné kompetence k znovuzahájení meiózy. S tím, jak se oocyt dostává z profáze do metafáze, dochází ke zvýšení hladiny cyklin-dependentní kinázy 1 (Cdk1). Cyklin-dependentní kinázy se podílejí na regulaci buněčného cyklu. Cdk1 se jeví jako esenciální pro spuštění signální kaskády fosforylací fosfatázy 1 a následnou fosforylací laminů A/C. Fosforylace těchto laminů je nutná pro rozvolnění jaderného obalu a rozpad zárodečného váčku (Adhikari *et al.*, 2012).

Když savčí oocyt vyjmeme z folikulu, dochází u něj ke spontánnímu znovuzahájení meiózy (Pincus & Enzmann, 1936). Po dobu, co se oocyt nachází uvnitř folikulu, je zadržen v profázi prvního meiotického dělení. Při aplikaci LH do intaktního folikulu se fosforyluje několik serinů (Ser) na konexinu 43 (Norris *et al.*, 2008). Přerušování spojů mezi granulózními buňkami je dostatečné pro znovuzahájení meiózy. Somatické buňky a komunikace mezi nimi, představují důležité prvky v pozastavení dělení oocyty (Richard & Baltz, 2014).

3.2 Cyklický AMP a jeho vliv na zastavení meiotického dělení

Dlouhodobě uznávaným konceptem pro zastavení meiotického dělení oocyty je zvýšení koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Jedny z prvních studií předpokládaly, že cAMP je produkováno granulózními buňkami a dále difunduje přes mezerové spoje do oocyty (Dekel, 1988). Pozornosti neunikl fakt, že oocyt je schopen cAMP produkovat také sám (Bornslaeger & Schultz, 1985).

Webb *et al.* (2002b) stimulovali kumulárně oocytární komplex pomocí FSH, díky kterému došlo k vyššímu nárůstu cAMP v oocyty. Při inhibici propustnosti mezerových spojů nedocházelo k transportu cAMP do oocyty a hladina cAMP v oocyty zůstala stejná, což nasvědčuje produkci cAMP v oocyty. Do intaktního myšího oocyty uzavřeném ve folikulu byla injikována protilátka, která neprochází skrz mezerové spoje. Tato protilátka inhibuje G_s podjednotku G proteinu, která stimuluje adenylát cyklázu. Adenylát cykláza konverguje v oocyty ATP na cAMP. Tím, že došlo k rozpadu zárodečného váčku a tvorbě prvního polárního tělíska se jedná o důkaz, že oocyt je sám zdrojem cAMP, které je tvořeno adenylát cyklázou (Mehlmann *et al.*, 2002). Předpokládá se, že u savců se jedná o univerzální a konzervovaný mechanismus (Gallo *et al.*, 1995; DiLuigi *et al.*, 2008).

3.3 Funkce receptorů spřažených s G proteinem

Receptory spřažené s G proteiny (GPCR) se podílejí na udržení G_s podjednotky v aktivním stavu. Z rodiny GPCR je nejhojněji v myším oocytu zastoupena *Gpr3* mRNA. Koncentrace *Gpr3* mRNA v oocytu byla změřena 10x vyšší než v okolních granulózních buňkách (Mehlmann, 2004). Ačkoliv je GPR3 zatím zařazen mezi tzv. sirotčí receptory, zdá se, že jeho ligandem by mohl být sfingosin-1-fosfát (S1P) a sfingosin fosforylcholin (SPC) (Kostenis, 2004). Předpokládá se, že receptor konstitutivně aktivuje G_s podjednotku.

Oocyty vložené do kultivačního média s S1P nebo SPC vykazovaly opožděné a inhibované dozrávání oproti kontrolní molekule, kterou byl sfingomyelin. O sfingomyelinu se ví, že není ligandem pro GPCR. Tyto experimenty naznačují, že GPR3 by mohlo být aktivováno ligandem lipidové povahy (Hinckley *et al.*, 2005).

Pro provádění genetických studií byl vytvořen knockoutovaný myší model, deficientní v genu *Gpr3* (*Gpr3*^{-/-}). Vaječníky těchto myší nevykazovaly žádné morfologické odlišnosti, ve velikosti či tvaru, v porovnání s wild type modelem (*Gpr3*^{+/+}). Na druhou stranu většina knockoutovaných prepubertálních vaječníků obsahovala oocyt, který spontánně zahájil meiózu a nacházel se v metafázi I nebo II. Po injekci *Gpr* mRNA do *Gpr3*^{-/-} oocytu k obnovení dělení nedošlo a oocyt zůstal pozastaven v profázi (Mehlmann, 2004). V dalším pokusu byla použita dvouvláknová interferující RNA pro snížení hladiny *Gpr3* mRNA v oocytu, který se nacházel ve folikulu. Oocyt nebyl schopen zůstat v profázi a následně u něj došlo k obnovení meiózy (Mehlmann, 2005). Z těchto pokusů vyplývá, že funkce GPR3 je významná pro udržení oocytu v profázi.

Při bližším testování G_s podjednotky na myších modelech bylo zjištěno, že GPR3 působí přes G_s protein na α podjednotku, která z plazmatické membrány oocytu disociuje a přesouvá se do cytoplazmy. Při porovnání lokalizace $G\alpha_s$ podjednotky v oocytu v preantrálním a antrálním folikulu bylo rozložení podjednotky v obou stádiích stejné. Z čehož vyplývá, že GPR3 je aktivována již v prvních stádiích folikulogeneze. Porovnáním výsledků oocytu uzavřeného ve folikulu a oocytu bez kumulárních buněk bylo zjištěno, že pro aktivitu GPR3 není potřeba okolních folikulárních buněk (Freudzon *et al.*, 2005).

3.4 Dráhy spouštěné cAMP při meiotickém arestu

Mechanismy, které kontrolují cyklus meiotického dělení v buňce závisí na regulaci *maturation promoting factor* (MPF). Tento komplex se skládá z katalytické podjednotky Cdk1 a regulační podjednotky cyklin B. MPF musí být konstitutivně inhibován pomocí fosforylace

pro to, aby bylo meiotické dělení zastaveno. Těto inhibice je možné dosáhnou regulací proteinu kinázy A (PKA), která je závislá na zvýšené hladině cAMP. PKA udržuje Cdk1 v neaktivní formě. V preovulačním myším oocytu PKA fosforyluje, a tím aktivuje kinázu Wee1B, která následně fosforyluje threonin 14 (Thr14) a tyrosin 15 (Tyr15) na Cdk1. Touto fosforylací dojde k inaktivaci Cdk1 a MPF komplex bude neaktivní. Oocyt díky této kaskádě bude zadržen v profázi (Han *et al.*, 2005).

Paralelně s tím PKA fosforyluje fosfatázu CDC25. U fosfatázy CDC25 byly nalezeny tři izoformy: A, B a C (Pirino *et al.*, 2009). U *Xenopus* sp. probíhá fosforylace CDC25C na Ser287 a u myši CDC25B na Ser321. Fosforylací dojde pravděpodobně ke konformační změně a na CDC25 vznikne vazebné místo pro protein 14-3-3 β . Při fosforylaci proteinu 14-3-3 β je CDC25B odloučena do cytoplazmy a není jí dovoleno dostat se do jádra. Pokud se CDC25 nemůže dostat do jádra a kontrolovat aktivitu MPF, oocyt zůstane uvězněn v profázi meiózy I (Duckworth *et al.*, 2002; Pirino *et al.*, 2009).

Pro obnovení meiotického dělení je potřeba defosforylovat Thr14 a Tyr15 na Cdk1. Toho je možné docílit nízkou koncentrací cAMP, které dále nebude aktivovat PKA. Tímto mechanismem se CDC25 stane aktivní, dojde k jejímu přenosu do jádra, kde defosforyluje aminokyselinové zbytky na Cdk1. Cdk1 se svojí aktivitou dále podílí na regulaci rozpadu zárodečného váčku (Pirino *et al.*, 2009).

3.5 Udržení oocytů v I. meiotickém bloku

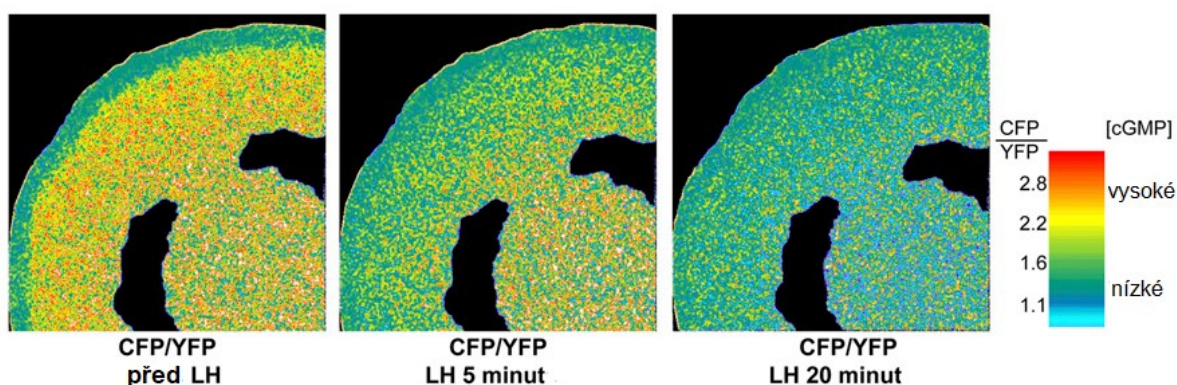
Proteiny, které oocyt využívá k tvorbě cAMP se syntetizují výhradně v oocytu. U myši se ukázalo, že cAMP je produkováno samotným oocytem v koncentraci dostačující pro udržení meiotického arestu, ovšem u oocytů hospodářských zvířat není situace tak jasná. V savčím oocytu, který se vyjme z folikulu, postupně klesá hladina cAMP a oocyt není schopen se udržet v profázi a spontánně obnoví meiotické dělení. Na vysvětlení tohoto problému existují dvě hypotézy.

První pohled více méně představuje již zmíněný mechanismus, že z granulóznic buněk vychází signál, který je zapotřebí pro syntetizování molekuly druhého posla v oocytu. Rozšířením této hypotézy může být možnost, že cAMP, které je tvořeno v somatických buňkách difunduje do oocytu skrz mezerové spoje. Touto difúzí by cAMP z okolních somatických buněk přispívalo ke zvýšení koncentrace cAMP v oocytu. Prozatím víme, že při nedostatku cAMP produkovaného systémem GPR3-G_s v oocytu není množství cAMP ze

somatických buněk dostatečné pro zastavení meiotického dělení (Mehlmann, 2005; *Jaffe *et al.*, 2017).

Druhá hypotéza je založena na předpokladu působení fosfodiesteráz. Fosfodiesterázy hydrolyzují fosfodiesterovou vazbu v cyklických nukleotidech, cAMP je přeměňováno na 5'-AMP, které v buněčné regulaci již nevykazuje vlastnosti druhého posla. Fosfodiesteráza, která zastává hlavní funkci při hydrolyze cAMP v oocyту je fosfodiesteráza 3A (PDE3A) (Masciarelli *et al.*, 2004). Zároveň u PDE3A dochází ke kompetitivní inhibici molekulami cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). Pro inhibici PDE3A alespoň z 80 % je dostačující 1-2 μM koncentrace cGMP uvnitř oocyту. cGMP je produkován somatickými buňkami a do oocyту se dostává difúzí přes mezerové spoje. V oocyту cGMP inhibuje aktivitu PDE3A, která by jinak hydrolyzovala cAMP a následně by došlo k obnovení meiotického dělení (Vaccari *et al.*, 2009).

Pro kvantitativní testování druhé hypotézy za fyziologických podmínek byla použita metoda Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Značené cAMP a cGMP bylo přeneseno do intaktního folikulu. Před aplikací LH byly mezerové spoje volně propustné pro cGMP, jehož difúzi bylo možné díky metodě FRET pozorovat. Po aplikaci carbenoxolone, což je inhibitor mezerových spojů anebo po přidání LH, který působí uzavření mezerových spojů, nedocházelo k difúzi cGMP z kumulárních buněk do oocyту. Následně došlo i ke snížení hladiny cAMP v oocyту (Norris *et al.*, 2008, 2009).



Obr. 3 Difúze značeného cGMP v rámci folikulu. Porovnání situace před a po aplikaci LH v určitých časových intervalech. Rovnoměrně rozložená koncentrace cGMP před aplikací LH postupně klesá nejprve v granulózních, poté kumulárních buňkách, a nakonec v oocyту. Thekální buňky nejsou propojeny mezerových spoji s granulózními buňkami, tudíž vykazují stále stejnou koncentraci cGMP. Převzato z Shuhaibar *et al.* (2015) a upraveno.

3.6 Tvorba cGMP granulózními buňkami

Rodina natriuretických proteinů představuje hormony, které v těle řídí rozličné fyziologické pochody. Patří mezi ně atriální natriuretický peptid (ANP), natriuretický peptid typu B (BNP) a natriuretický peptid C (CNP). Některé z nich se podílejí na obnově meiotického dělení (*Potter *et al.*, 2009).

Jedním z receptorů pro natriuretické proteiny je guanylát cykláza B (NPR2), která tvoří cGMP. NPR2 se vyskytuje jako homooligomerní transmembránový protein skládající se z několika domén (Potter, 2011), který se nachází především (z ~97 %) v granulózních a v menší míře v kumulárních a thekálních buňkách (Shuhaibar *et al.*, 2016). *Npr2* mRNA se vyskytuje hlavně v kumulárních buňkách v blízkosti antra (M. Zhang *et al.*, 2010). Na druhou stranu se pouze u skotu potvrdil výskyt NPR2 na membráně oocyty (Xi *et al.*, 2018).

Již dlouhou dobu je známo, že granulózní buňky produkují do folikulární tekutiny inhibitor zrání oocyty o velikosti ~2 kDa. Kritériím nejlépe vyhovuje CNP, které je tvořeno v granulózních buňkách, difunduje přes antrum folikulární tekutinou ke kumulárním buňkám, kde se váže na NPR2 (M. Zhang *et al.*, 2010; Kawamura *et al.*, 2011). Aktivování NPR2 je závislé na fosforylaci Ser a Thr na jedné z domén, defosforylaci dochází k inaktivaci NPR2 a rychlému obnovení meiotického dělení oocyty (Potter, 2011; Shuhaibar *et al.*, 2016). Defosforylace NPR2 je prováděna fosfatázami z rodiny PPP (Egbert *et al.*, 2014).

Hormony BNP a CNP se vyskytují v oběhové soustavě v několikanásobně nižší koncentraci než ve folikulární tekutině. Z toho můžeme usuzovat, že za fyziologických podmínek BNP a CNP přispívají u prasat k zastavení meiotického dělení parakrinní signalizací z folikulů (Zhang *et al.*, 2015).

Kultivací prasečího kumulárně oocytárního komplexu s CNP bylo možno dosáhnout zastavení oocyty v profázi meiózy I i po 44 hod (Zhang *et al.*, 2015). M. Zhang *et al.* (2010) zjistili, že CNP, na rozdíl od ANP či BNP, bylo schopno zabránit spontánní obnově meiotického dělení oocyty, který se nacházel ve folikulu. Po označení CNP a BNP se ukázalo, že oba hormony se v prasečích folikulech váží s podobnou afinitou na NPR2. Z těchto poznatků vyplývá, že se na aktivaci NPR2 může podílet nejenom CNP, ale i BNP (Zhang *et al.*, 2015). BNP a CNP po navázání na NPR2 zvyšují množství cGMP produkovaného NPR2 v kumulárních buňkách. cGMP je produkováno v dostatečné míře na to, aby koncentrace cAMP v oocyty byla postačující k zadržení meiotického dělení po dobu 12 hod (Zhang *et al.*, 2014, 2015; Xi *et al.*, 2018).

Zastavení meiotického dělení v profázi I je událost, která u lidí může trvat až desítky let. Oocyt se nachází v komplexní struktuře ovariálního folikulu, kde mezi sebou komunikují různé buněčné typy. Molekuly cGMP, které jsou tvořeny NPR2 v granulózních buňkách difundují do oocyta, kde inhibují PDE3A. Dostatek cAMP je důležitý pro mnoho dílčích procesů, které zadrží oocyt v profázi meiózy I. Tento sled událostí se mění v okamžiku, kdy se z hypofýzy vyplaví gonadotropin a dojde k obnovení meiotického dělení.

4 Znovuobnovení meiotického dělení

Gonadotropní hormony v tělech savců se podílejí na vývoji pohlavních orgánů a pohlavních buněk. Zároveň se podílejí na tvorbě dalších pohlavních hormonů v gonádách. Mezi gonadotropiny, které vznikají v hypofýze, se řadí FSH a LH. Díky jejich činnosti dochází k růstu a zrání folikulu, ovulaci a tvorbě žlutého tělíska. V těhotenství je v placentě tvořen třetí gonadotropin, nazývaný choriogonadotropin (hCG) (Hillier, 2001).

4.1 Gonadotropiny a faktory podobné EGF

LH je heterodimer vznikající v hypofýze a skládající se z nekovalentně spojených α a β podjednotek cysteinovými můstky o velikosti ~29 kDa (*Palermo, 2007). Podjednotka α se skládá z 92 aminokyselin a β ze 120 aminokyselin (*Ezcurra & Humaidan, 2014). LH je syntetizován a sekretován pod kontrolou GnRH a po jeho zvýšené sekreci dochází k dokončení prvního meiotického dělení u oocyty zastaveného v profázi meiózy I (Tsafriri *et al.*, 1972).

hCG se vyskytuje jako heterodimer, který má velikost asi ~36,7 kDa a obsahuje 244 aminokyselin (*Ezcurra & Humaidan, 2014). Ze sekvenční analýzy je zřejmé, že se jedná o homolog glykoproteinových hormonů. hCG hormon se podílí na udržení těhotenství tím, že pomáhá při placentaci a při brzkém embryonálním vývoji (Wu *et al.*, 1994).

LH se na membráně váže na receptor pro LH (LHR). LHR se asi 80-90 kDa velký a spadá do skupiny GPCR (*Segaloff & Ascoli, 1993). Tyto receptory se skládají z extracelulární domény, která váže hormon a sedmkrát membránou procházející doménou, která receptor kotví v membráně. Pomocí interakcí intracelulárních smyček se signál přenáší na G proteiny (*Dufau, 1998; *Palermo, 2007). G_s protein aktivuje adenylát cyklázu, tvorbu fosfatidylinositolu a inositol trisfosfátu nebo aktivuje mitogenem aktivovanou protein kinázu (MAPK). LH a hCG jsou strukturně podobné a s velkou afinitou se váží na LHR. mRNA kódující LHR byla u prasat detekována v kumulárních buňkách oocyty (Shimada *et al.*, 2003). Zjištěný poločas života se u hCG pohybuje mezi 24-36 hod (Yen *et al.*, 1968; *Cole, 2012) a u LH, respektive u rekombinantního LH, se pohybuje od 4 do 12 hod (Yen *et al.*, 1968; le Cotonnec *et al.*, 1998). Delší poločas života hCG vede k větší vaznosti a stabilitě při navázání na LH/hCG receptor (*Theofanakis *et al.*, 2017). LHR se nachází majoritně na thekálních a granulózních buňkách (*Ascoli *et al.*, 2002).

FSH, stejně jako LH je syntetizován gonadotropními buňkami v hypofýze. Jedná se o glykoproteinové hormony, které na své proteinové struktuře mají navázané uhlovodíkové zbytky jako fruktóza, manóza, galaktóza, acetylglukosamin a kyselina N-acetylneuraminová.

Poločas života FSH molekuly v plazmě se pohybuje okolo 150 min a receptory pro FSH se nacházejí především na granulózních buňkách. Thekální a granulózní buňky jsou schopny syntézy androgenů a estrogenů (*Palermo, 2007). FSH je důležitý gonadotropin pro kultivaci prasečích oocytů, jelikož bez něj nedochází k dostatečné expanzi folikulu a tvorbě antra. Kombinací FSH a LH je možné dosáhnout velkého počtu kompetentních oocytů, které se mohou po oplození vyvinout do stádia blastocysty. FSH je nezbytný pro formování preantrálního folikulu, oocytu se schopností obnovit zrání a dále se embryonálně vyvíjet. Kombinací FSH a LH je možné získat oocyty lepší kvality (Shimada *et al.*, 2003), které jsou po obnovení dělení schopné kvalitnějšího embryonálního vývoje (Wu *et al.*, 2007).

Rodinu EGF a jemu podobných faktorů u savců tvoří: epidermální růstový faktor (EGF), transformující růstový faktor alfa (TGF- α), heparin vázající epidermálnímu proteinu podobný růstový faktor (HB-EGF), betacelulin (BTC), epiregulin (EREG), amfiregulin (AREG), epigen a komplex neuregulinů (NRG1-6) (*Yarden & Sliwkowski, 2001).

LH působí krátkodobou a dlouhodobou expresí epidermálních růstových faktorů AREG, EREG a BTC. Tyto faktory jsou pomocí autokrinní anebo parakrinní signalizace dále schopny přenášet signál implikovaný LH. Faktory podobné EGF jsou exprimované jako transmembránové formy (Park *et al.*, 2004), které jsou proteolyticky odštěpeny metaloproteázami z rodiny ADAM. U prasat byla v kumulárních buňkách detekována mRNA metaloproteázy ADAM17 (Yamashita *et al.*, 2009) a u skotu se nacházela především v granulózních a thekálních buňkách (Li *et al.*, 2009).

Betacelulin (BTC) je jeden z faktorů podobných EGF, který je přibližně 32 kDa velký a vzniká podobně jako ostatní faktory podobné EGF proteolytickým odstřížením prekurzoru od membrány. BTC byl popsán při kultivaci kultury nádorů myších pankreatických β buněk (Shing *et al.*, 1993).

Epiregulin (EREG) byl izolován z myších fibroblastových nádorových buněk. Jedná se o faktor podobný EGF, který má částečně shodnou aminokyselinovou sekvenci s ostatními faktory podobnými EGF. EREG je polypeptid o délce 46 aminokyselin, který se váže na EGF receptor (Toyoda *et al.*, 1995).

Amfiregulin (AREG) byl izolován z lidských nádorových buněk prsu. Jedná se o 162 aminokyselin dlouhý homolog epidermálního růstového faktoru o velikosti asi 18,8 kDa. AREG se váže na EGF receptor (Shoyab *et al.*, 1989).

Faktory podobné EGF se váží na homo- a heterodimerní receptory z rodiny EGF receptorů (EGFR), např.: ErbB1 (Park *et al.*, 2004).

4.2 EGFR receptor

Signál faktorů podobných EGF je do buňky zprostředkován pomocí transmembránových receptorů rodiny EGFR (ErbB1, ErbB2, ErbB3, a ErbB4) (*Yarden & Sliwkowski, 2001), skládajících se z extracelulární domény s dvěma cysteinovými zbytky, transmembránové a cytoplazmatické domény, která obsahuje konzervovanou oblast s tyrozinovými kinázami. (*Sanderson *et al.*, 2006). Receptor po dimerizaci a autofosforylaci v cytoplazmě aktivuje další přenos signálu. Předpokládá se, že GPCR se podílejí na fosforylaci EGFR, čímž zprostředkovávají jeho aktivaci (*Holbro & Hynes, 2004).

EGF se váže pouze na receptory ErbB1. Do první skupiny podle vazebné specifity můžeme zařadit EGF, TGF- α , AREG, které se váží specificky na ErbB1. Do druhé skupiny se řadí BTC, HB-EGF a EREG, které vykazují afinitu k ErbB1 a ErbB4 (Johnson *et al.*, 1993; Riese *et al.*, 1998). Třetí skupina obsahuje neureguliny. Pro ErbB2 prozatím nebyl nalezen žádný vysoce specifický ligand (*Holbro & Hynes, 2004).

Signální dráhy iniciované faktory podobnými EGF se různými cestami stýkají na EGFR. Většina faktorů podobných EGF pravděpodobně působí skrze kumulární buňky, jelikož se zde vyskytuje mRNA *ErbB1*, pomocí které je kódován receptor pro vazbu AREG (Zamah *et al.*, 2010). Není ovšem vyloučeno, že zásoba prekurzorů faktorů podobných EGF se nachází na povrchu granulózniích buněk ještě před působením LH (*Conti *et al.*, 2006).

Již po 30 min od podání LH je možné pozorovat nástup fosforylace na EGFR, která je způsobena *de novo* syntézou faktorů podobných EGF nebo jejich využitím z intracelulárních zásob. K expresi *AREG* a *EREG* a poté *BTC* mRNA došlo mezi 30 min až 3 hod po aplikaci LH nebo hCG, maximem po 2 hod (Park *et al.*, 2004; Panigone *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2011) a hCG u koní vyvolá po 36h zvýšení *EREG* mRNA (Li *et al.*, 2009). Místy s největší expresí těchto genů jsou granulózní buňky preovulačních folikulů (Park *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009). Stimulací gonadotropiny došlo mezi 20 a 40 hod u koní a u skotu k zvýšení *Areg*, *Ereg* a *Adam17* mRNA v granulózniích a thekálních buňkách (Li *et al.*, 2009; Sayasith *et al.*, 2013).

Vystavení myších a krysích folikulů působení AREG a EREG mělo stejný výsledek na expresi mRNA jako působení LH, po kterém následovala obnova meiotického dělení (Park *et al.*, 2004; Ashkenazi *et al.*, 2005). Zdá se, že faktory podobné EGF budou působit podobným způsobem i mezi druhy. Při působení LH došlo k rozvolnění zárodečného vaku za 4 hod, ale

přidáním samotného AREG a EREG se dosáhlo stejného výsledku po 2 až 3 hod (Park *et al.*, 2004; Norris *et al.*, 2010). Rozdíl ve zkrácení doby působení exogenních růstových je dán tím, že růstové faktory nemusí být syntetizovány, jako při aplikaci LH, ale působí v signální dráze bezprostředně po přidání do média a po vazbě na příslušný receptor.

EREG, stejně jako LH a EGF, ovšem s nižší účinností, je schopen navodit expresi *Ptgs2*, *HAS2* mRNA, které se podílejí na syntéze extracelulární matrix při expanzi kumulárních buněk. Tyto proteiny jsou důležité pro produkci a zadržení kyseliny hyaluronové v krysím folikulu a v prasečím kumulárně oocytárním komplexu. Schopnost expanze kumulárních v důsledku aplikace EGF je přímo úměrná velikosti folikulu. (Procházka *et al.*, 2000; Ashkenazi *et al.*, 2005).

Po aktivaci EGFR může být signál přeměřován přímo na MAPK1/3, ale pravděpodobně se na regulaci podílejí i další dráhy (Hsieh *et al.*, 2011), kdy EGFR iniciuje částečné uzavření mezerových spojů a snížení cGMP v granulózních buňkách (Norris *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013), snížení *Npr2* mRNA kumulárně oocytárnímu komplexu (Liu *et al.*, 2014), nebo zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} v kumulárních buňkách (Wang *et al.*, 2013).

mRNA kódující EGFR, o velikosti 170 kDa, byla detekována v kumulárních buňkách z různých stádiích folikulárního vývoje. Ovšem pouze EGFR z velkých antrálních folikulů (> 6 mm) jsou aktivovatelné fosforylací na tyrozinech, iniciované vazbou EGF. Kultivací kumulárně oocytárního komplexu z preantrálních folikulů s FSH se dosáhlo stejného stavu EGFR na kumulárních buňkách, který se normálně vyskytuje na kumulárních buňkách ve velkých antrálních folikulech. Zároveň se kultivací oocytárně kumulárního komplexu s FSH a EGF se dosáhlo lepšího výsledku expanze kumulárních buněk, z čehož vyplývá, že FSH je u prasat důležité pro expanzi kumulárních buněk (Prochazka *et al.*, 2003).

Používáním specifických inhibitorů dochází k prosazení názoru, že gonadotropiny spouští signální kaskádu, kde EGF a jemu podobné faktory působí jako ligandy přes tyrozinkinázové receptory rodiny EGFR. Dimerizací se aktivují kinázy, které vedou k fosforylaci tyrozinů na cytoplazmatické části EGFR a tím dochází k ovlivnění buněčných procesů pro obnovu meiotického dělení oocyty (Hsieh *et al.*, 2011). Rychlý nástup aktivace EGFR se zdá být důležitým krokem k obnovení meiotického dělení oocyty (Panigone *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2011).

4.3 Zvýšení cAMP po stimulaci LH

Přidání LH do kultivačního média dochází při kultivaci intaktního folikulu k rozpadu zárodečného váčku a k obnově meiotického dělení oocyty. K obnově dělení dochází také po přidání hCG nebo FSH. Signál LH je přenesen přes $G\alpha_s$ podjednotku na adenylát cyklázu, která tvoří cAMP (Tsafriri *et al.*, 1972). Z toho plyne, že nárůst koncentrace cAMP představuje spolehlivý znak obnovy meiotického dělení (Webb *et al.*, 2002a).

LH působí na GPCR, a to může způsobit dvě různé vlny cAMP. Krátkodobou stimulací receptorů na povrchu buněk vzniká první vlna cAMP, zatímco dlouhodobá tvorba cAMP je závislá na internalizaci komplexu GPCR s ligandem do buňky. Folikul stimulovaný LH vykazoval nárůst intracelulární koncentrace cAMP u krys (Tsafriri *et al.*, 1972) a u myši především v kumulárních a granulózních buňkách (Lyga *et al.*, 2016). Oocyty, které byly stimulovány LH a následně opláchnuty, reverzibilně vykazovaly druhou vlnu cAMP signalizace, pozorovatelnou ve všech buněčných typech okolo oocyty. Předpokládá se, že se jedná o přetrvávající stimulaci produkce cAMP po internalizaci LH receptoru do intracelulárního prostoru. Tímto způsobem pravděpodobně dochází k přenosu signálu z LHR a navození obnovy meiotického dělení (Lyga *et al.*, 2016).

Stimulací kumulárně oocytárního komplexu fetálním hovězím sérem a gonadotropiny, dochází u skotu po 3 hod k nárůstu koncentrace cAMP a po 7 hod dosahuje koncentrace maxima (Luciano *et al.*, 2004). Kultivací prasečích oocytů v médiu s FSH a LH dochází ke kontinuálnímu nárůstu koncentrace cAMP v oocyty obklopeném kumulárními buňkami. Po 8 hod kultivace je koncentrace cAMP nejvyšší a dramaticky klesá po 12 hodinách (Shimada & Terada, 2002).

Nárůst koncentrace cAMP v somatických buňkách okolo oocyty vede skrze signální dráhy ke snížení koncentrace cAMP v oocyty, což má za následek obnovu meiotického dělení. Tento proces byl pozorován napříč různými druhy.

4.4 MAPK dráha

Signalizace pomocí G proteinů se podílí na regulaci MAPK drah. Rodina G proteinů se dělí do čtyř tříd (G_s , G_i , G_q , G_{12}), které různými mechanismy regulují MAPK1/3, MAPK14, MAPK7, MAPK8 a MAPK12. $G_s\alpha$ přenáší signál k adenylát cykláze, která je schopna konverze ATP na cAMP, které aktivuje PKA (*Goldsmith & Dhanasekaran, 2007).

MAPK jsou rozšířená rodina kináz podílející se na buněčných pochodech jako je např. mitóza, buněčná diferenciace nebo proliferace. Na regulaci meiotického dělení oocyty se

podílejí malé GTPázy, které fosforylací aktivují MAP3K, MAP2K až MAPK. MEK představuje jednu z MAP2K vyskytující se v granulózních buňkách i oocyty (Su *et al.*, 2002). Kromě aktivace MAP2K může dojít k stimulaci MAPK přímo MAP3K. Touto kinázou je protein Mos v kumulárně oocytárním komplexu (Su *et al.*, 2002) a RAS/RAF v granulózních buňkách (Verlhac, 2000; Prochazka *et al.*, 2019).

LH a FSH v kumulárních a granulózních buňkách u prasat aktivovaly — skrze další dílčí signální dráhy — MAPK1/3 (Cameron *et al.*, 1996; Prochazka and Nemcova, 2019), čímž došlo k nárůstu *Has2* a *Ptgs2* mRNA, které jsou nezbytné pro expanzi kumulárních buněk (Yamashita *et al.*, 2007). V kontrolním médiu bez FSH zůstala aktivita MAPK1/3 na bazální úrovni po celou dobu kultivace (Prochazka *et al.*, 2019). U myši MAPK1/3 byly nalezeny jak v oocyty, tak ve folikulu (Sela-Abramovich *et al.*, 2005) a k fosforylaci MAPK1/3 a MAPK14 (Liu *et al.*, 2010) majoritně docházelo v granulózních buňkách (Panigone *et al.*, 2008). Inhibicí MAPK1/3 pomocí U0126 se snížila exprese *Has2* a *Ptgs2* mRNA, ale snížení cAMP v granulózních buňkách nenastalo a kumulární buňky zůstaly těsně spojeny s oocytem i folikulárními buňkami. (Su *et al.*, 2003). Omezení expanze kumulárních buněk způsobilo také porušení aktivity MAPK14 (Liu *et al.*, 2010).

Vytvořením mutantních myši (*Areg*^{-/-} *Egfr*^{wa2/wa2} a *Egfr*^{delta/f} *Cyp19-Cre*) bylo zjištěno, že LH iniciuje fosforylaci MAPK1/3 a MAPK14 po 30 min od aplikace, s maximem po 2 hod ve folikulu a granulózních buňkách (Liu *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2011). Použitím fyziologických koncentrací FSH (100 ng/ml) a LH (10 ng/ml) došlo i u prasete k aktivaci MAPK1 v cytoplazmě a k aktivaci MAPK1/3 v jádře granulózních buněk (Cameron *et al.*, 1996). U myši bylo potvrzeno, že aktivita MAPK v kumulárních buňkách je důležitá pro obnovu meiotického dělení (Su *et al.*, 2002), což bylo potvrzeno i u prasat kdy již po několika minutách po stimulaci gonadotropiny byla pozorována aktivita MAPK1/3 v kumulárních buňkách, která přetrvávala po 42 hod (Prochazka *et al.*, 2019) a zároveň přibližně po 2 hod od začátku kultivace došlo k translokaci MAPK do jádra (Cameron *et al.*, 1996).

MAPK aktivita nebyla pozorována v oocytech myši deficientních v genu MOS (*MOS*^{-/-}), které byly stimulovány gonadotropiny. Na rozdíl od toho byla MAPK v kumulárních buňkách aktivována ještě před aplikací gonadotropinů. Inhibicí MAPK aktivity v *MOS*^{-/-} nedošlo k rozpadu zárodečného váčku (Su *et al.*, 2002) a snížená fosforylace MAPK1/3 vedla k redukci jaderného i cytoplazmatického zrání v oocyty (Mo *et al.*, 2014).

Aktivaci MAPK1/3 je možné navodit také pomocí AREG (Prochazka & Nemcova, 2019) a EGF (Cameron *et al.*, 1996), které stimulují aktivitu EGFR. Přidáním inhibitoru AG1478 proti EGFR došlo ke snížení aktivace MAPK1/3. Tyto poznatky naznačují, že k aktivaci MAPK dráhy dochází až po EGFR (Su *et al.*, 2003; Hsieh *et al.*, 2011). Na udržení aktivity MAPK1/3 se pravděpodobně nepodílí pouze jedna dráha, ale více paralelních drah, jako např. PDE3A (Hsieh *et al.*, 2011) nebo SRC a PKC, které jsou u prasat stimulovány pomocí FSH (Prochazka *et al.*, 2019) a aktivují EGFR (Liu *et al.*, 2010), ale zároveň s tím je nutná *de novo* syntéza faktorů podobných EGF (Prochazka *et al.*, 2019).

Načasování spuštění MAPK1/3 drah pomocí gonadotropinů a cytokinů je při *in vitro* kultivaci důležitý bod pro správné zrání oocyta a aktivaci expanze kumulárních buněk (Yuan *et al.*, 2017).

4.5 Snížení propustnosti mezerových spojů

LH snižuje propustnost a vodivost mezerových spojů mezi granulózními buňkami (Sela-Abramovich *et al.*, 2005; Norris *et al.*, 2008). Konexin 43 je u prasat exprimován především v granulózních a kumulárních buňkách (Itahana *et al.*, 1996).

Příčinou snížení propustnosti je u hlodavců fosforylace serinů na konexinu 43 pomocí MAPK1/3 (Sela-Abramovich *et al.*, 2005) a MAPK14 (Hsieh *et al.*, 2011). U prasat se na fosforylaci konexinu 43 pravděpodobně podílí jiné než MAPK dráhy (Shimada *et al.*, 2001). Předpokládá se, že MAPK1/3 dráha je závislá na působení EGFR (Panigone *et al.*, 2008), jelikož po inhibici EGRF nedochází k rozpadu zárodečného váčku a zároveň se snižuje cGMP, což ovlivňuje další dráhy pro obnovu meiotického dělení (Norris *et al.*, 2010).

Maximální fosforylace serinů na konexinu 43 se objevovala mezi 0,5-1 hod od aplikace LH u myší (Sela-Abramovich *et al.*, 2005). Nárůst množství konexinu 43 předcházela fosforylaci konexinu 43 ve vnějších vrstvách kumulárních buněk u prasat, která byla pozorována po 28 hod kultivace (Shimada *et al.*, 2001). Přidáním carbenoxolone, inhibitoru pro mezerové spoje došlo k jejich blokování v neporušeném myším folikulu. Paradoxní se zdá být fakt, že LH působí rozvolnění zárodečného váčku i při propustnosti mezerových spojů (Sela-Abramovich *et al.*, 2005).

Zdá se, že obnova meiotického dělení se u prasat odvíjí od snížení množství konexinu 43 ve vnějších vrstvách a fosforylaci konexinu 43 ve vnitřních vrstvách granulózních buněk (Shimada *et al.*, 2001). Ale zároveň i přerušením MAPK a EGFR dráhy stále dochází k obnově

meiotického dělení, pravděpodobně dalšími drahami spouštěnými LH a FSH (Norris *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2011).

4.6 CNP, aktivita NPR2 a následné snížení cGMP

Koncentrace CNP a BNP byly zvýšeny ve folikulární tekutině folikulů velkých 3-6 mm. Kultivací oocytů, izolovaných z malých folikulů (3-6 mm), s 100 ng/ml BNP a CNP došlo ke zlepšení vývojových kompetencí oocytů a následnému vývoji blastocyst. *Nppb* a *Nppc* mRNA byla detekována v granulózních buňkách folikulů všech velikostí a fyziologické koncentrace BNP se pohybovaly okolo 60 ng/ml a CNP 35 ng/ml ve folikulu. BNP i CNP inhibovaly aktivaci kumulárně oocytárního komplexu (Zhang *et al.*, 2017).

Pokles koncentrace CNP (až o 90 %) je pomalejší proces objevující se až po 2, respektive 4 hodinách od aplikace LH nebo hCG (Kawamura *et al.*, 2011; Egbert *et al.*, 2014). Množství NPR2 proteinu po aplikaci LH neubývá, ale pravděpodobně dochází k jeho inaktivaci pomocí defosforylace, která může být iniciována zvýšením intracelulárního Ca^{2+} a/nebo aktivací PKC (Robinson *et al.*, 2012).

LH, hCG nebo AREG snížily množství *Nppb* a *Nppc* mRNA v granulózních buňkách a následně i syntézu těchto proteinů (Kawamura *et al.*, 2011). LH a AREG zároveň redukovaly množství *Npr2* mRNA v kumulárních buňkách. Poklesem dostupnosti ligandu CNP pro NPR2 dochází ke snížení koncentrace cGMP v oocyту a následně k obnově meiotického dělení. (Norris *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

CNP může být použito jako inhibitor obnovy spontánního nebo předčasného zrání oocyту a tím dává prostor na synchronizaci jaderné a cytoplazmatické kompetence oocyту, izolovaných z předpubertálních samic. Zlepšení kultivačních podmínek oocytů při *in vitro* fertilizaci by mohl napomoci právě mezidruhově potvrzený koncept funkce CNP.

4.7 Fosfodiesterázy

Folikul exprimuje značné množství fosfodiesteráz, enzymů zodpovědných za hydrolýzu cyklických nukleotidů. Ačkoliv se nejvíce ve folikulu vyskytuje *Pde1a* mRNA, důležitou úlohu má PDE5A. Po aplikaci LH dochází fosforylací ke zvýšení aktivity PDE5A (Egbert *et al.*, 2014) a tím i ke zvýšené hydrolýze cGMP (Egbert *et al.*, 2016). Kromě defosforylace a snížené aktivity NPR2 představuje fosforylace a nárůst aktivity PDE5A další mechanismus, který se podílí na poklesu hladiny cGMP v somatických buňkách folikulu.

LH indukované snížení koncentrace cGMP v somatických buňkách, vede ke snížení cGMP v oocyту, a to působí zvýšenou aktivitu PDE3A (Vaccari *et al.*, 2009). Regulací PKA

je aktivita PDE3A také zvýšena a dochází v oocyty ke snížení cAMP dostatečně na to, aby došlo k rozvolnění zárodečného vaku (Norris *et al.*, 2009).

U deficientních myší v tomto genu nebo inhibicí PDE3A byla hladina cAMP v izolovaných oocytech zvýšena a nedošlo u nich k obnově meiotického dělení (Masciarelli *et al.*, 2004). Pro znovuzahájení meiotického dělení je potřeba aktivita různých fosfodiesteráz.

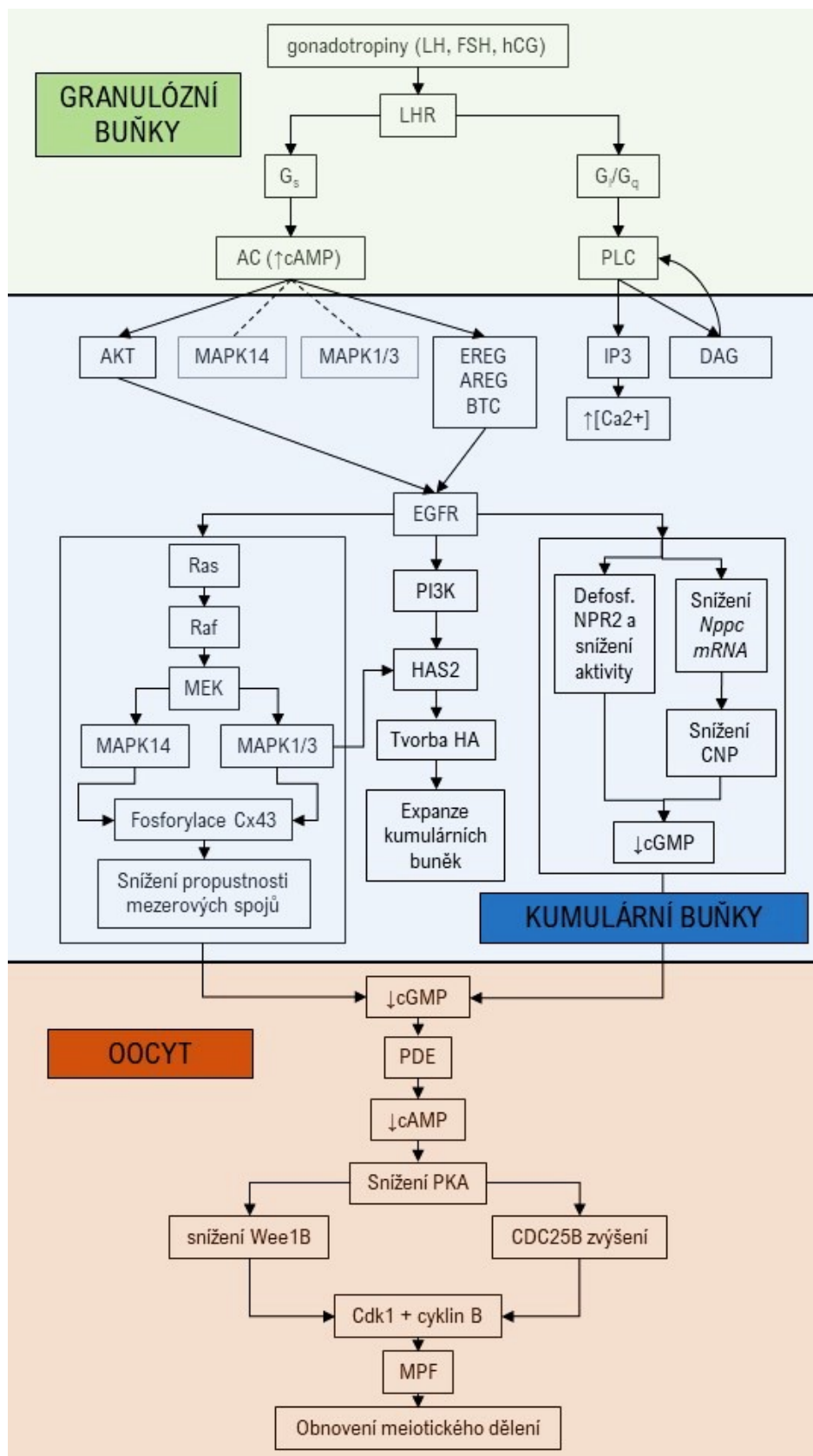
4.8 Další procesy spouštěné při obnově meiotického dělení

LH a FSH mohou přes fosfolipázu C (PLC), PKC nebo fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K) v granulózních buňkách aktivovat MAPK dráhu (Ito *et al.*, 2010). FSH při obnově meiotického dělení u prasat je schopno navodit hydrolýzu fosforylované formy fosfatidylinositolu, čímž se aktivuje PKC (Su *et al.*, 1999). U skotu je situace jiná, aktivita PI3K blokovala zrání oocyty, ale další životaschopnost oocyty tvořit blastocystu ovlivněna nebyla (de Souza *et al.*, 2018).

Gonadotropiny jsou schopny navodit zvýšení koncentrace Ca^{2+} , které může působit jako druhý posel v buněčné signalizaci. Ke zvýšení Ca^{2+} může dojít buď mobilizací intracelulárních zásob (Su *et al.*, 1999) nebo influxem přes membránu z extracelulárního prostředí (Flores *et al.*, 1998). PI3K se pravděpodobně do značné míry podílí na obnovení meiotického dělení u prasat (Park *et al.*, 2011).

Některé studie tuto aktivační dráhu nepodporují (Webb *et al.*, 2002b) a u některých studií se zdá, že Ca^{2+} není nezbytný pro aktivaci oocyty ani pro zvýšení vnitrobuněčného pH (Ruddock *et al.*, 2001), ale další vývoj oocyty je následně do značné míry omezen (Wang *et al.*, 1999). Zdá se, že signalizace pomocí Ca^{2+} je důležitá pouze pro správný vývoj prvojádra (Ruddock *et al.*, 2001).

Z těchto informací můžeme usoudit, že další dráhy podílející se na obnově meiotického dělení zatím nejsou jednoznačně potvrzeny a mezi druhy se role jednotlivých proteinů pravděpodobně liší.



Obr. 4 Schéma signální kaskády při obnově meiotického dělení. Po vyloučení gonadotropinů z hypofýzy dochází k jejich vazbě na receptor pro luteinizační hormon (LHR). Jeho aktivitou se spouští dvě různé reakce podjednotek receptorů spřažených s G proteiny. G_i nebo G_q spouští aktivitu fosfolipázy C (PLC), která tvorbou druhých posílů, inosito-3-fosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG),

zvyšuje koncentraci Ca^{2+} v kumulárních buňkách. G_s podjednotka spouští adenylát cyklázu, tvořící cAMP, které difunduje skrze mezerové spoje do kumulárních buněk, čímž se spouští další část signální kaskády. EGF receptor je aktivován faktory podobnými EGF (EREG, AREG, BTC), případně také protein kinázou B (PKB). Během několika minut dojde díky zvýšené aktivitě EGFR k defosforylaci a snížení aktivity guanylát cyklázy (NPR2), čímž se sníží koncentrace cGMP v kumulárních buňkách. K pomalejšímu snížení cGMP dochází přes pokles množství ligandu (CNP) a jeho mRNA (Nppc) pro NPR2. EGFR se také podílí na aktivaci MAPK1/3 a fosfoinositol-3-kinázy (PI3K), čímž se exprimuje gen HAS2, který je nezbytný pro tvorbu kyseliny hyaluronové, díky které expandují kumulární buňky. Rychlým výsledkem působení EGFR je spuštění Ras-Raf-MEK-MAPK dráhy, kterou dochází k fosforylaci aminokyselinových zbytků na konexinech (Cx43) a následně dochází ke snížení propustnosti mezerových spojů mezi kumulárními buňkami a oocytem. Snížení cGMP v oocytu dojde k přerušení inhibice fosfodiesterázy (PDE), která začne hydrolyzovat cAMP, čímž se sníží jeho množství v oocytu. Nižší množství cAMP má za následek pokles aktivity protein kinázy A (PKA), ta se podílí na snížení aktivity Wee1B a zvýšení aktivity CDC25B. Díky defosforylaci cyklin dependentní kinázy (Cdk1) v komplexu s cyklinem B, dojde k uvolnění MPF a následně obnově meiotického dělení. Vytvořeno na základě publikací Wayne et al., 2007; Norris et al., 2010; Hsieh et al., 2011; Conti et al., 2012; Prochazka et al., 2012; Robinson et al., 2012; Wang et al., 2013; Liu et al., 2014; Blaha et al., 2017.

5 Růstové faktory

Gonadotropiny se značným způsobem podílejí na obnovení meiotického dělení. Přidáním růstových faktorů do kultivačního média se může podpořit další *in vitro* vývoj.

5.1 FGF10

Fibroblastový růstový faktor 10 (FGF10) je jedním z růstových faktorů, který se může podílet na zlepšení kultivačních podmínek. Přidáním FGF10 do kultivačního média došlo ke zvýšení počtu expandovaných kumulárních buněk na oocytech (K. Zhang *et al.*, 2010), což může být způsobeno přijetím většího množství glukózy (Caixeta *et al.*, 2013). Zlepšení kultivačních podmínek bylo viditelné i na tvorbě normálního jádra a tvaru dělicího vřeténka. FGF10 změnil expresi genů spojených s kvalitou embrya (K. Zhang *et al.*, 2010). Exprimoval se gen *HAS2*, který je nezbytný pro syntézu kyseliny hyaluronové a je důležitý pro správnou expanzi kumulárních buněk. Počet oocytů s rozvolněným zárodečným váčkem se také zvýšil. Kultivací oocytů v médiu s FGF10 se zvýšil počet úspěšně kultivovaných embryí (K. Zhang *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2017). FGF10 napomohlo zrání oocyty jako (Pan *et al.*, 2019), krávy (Diógenes *et al.*, 2017a) i prasete a následně i vývoji embrya (Diógenes *et al.*, 2017a; Son *et al.*, 2017). Pozorováno bylo také rychlejší dělení blastocyst, které obsahovaly větší počet buněk, tudíž byly kvalitnější (K. Zhang *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2017).

FGF10 se primárně váže v granulózniích buňkách na receptory FGFR1b a FGFR2b (Buratini *et al.*, 2007; K. Zhang *et al.*, 2010). Tyto receptory byly u buvola objeveny ve všech folikulárních stádiích a mRNA pro tyto receptory byla u buvola detekována v granulózniích buňkách i v oocyty (Du *et al.*, 2018). U skotu se transkripty pro FGFR1 nacházely především v kumulárních buňkách a transkripty FGFR2 v oocyty (K. Zhang *et al.*, 2010; Castilho *et al.*, 2014).

mRNA pro *FGF10* byla nalezena ve všech stádiích folikulů u skotu a mRNA i protein byly objeveny jak v oocyty, tak v thekálních buňkách. FSH se podílelo na regulaci exprese FGF10 v thekálních buňkách, a zároveň množství *FGF10* mRNA sloužilo jako ukazatel zdravých folikulů (Buratini *et al.*, 2007).

Během týdne po ovulaci u skotu dochází v reprodukčním traktu k expresi genu pro FGF10 (Tríbulo *et al.*, 2018). FGF10 se může značně podílet na vývoji oocyty a kvalitě blastocyst, ovšem některé studie žádný pozitivní vliv nepozorovaly (Diógenes *et al.*, 2017b).

5.2 FGF2

Gen pro FGF2 se nachází na chromozomu číslo 17 a jedná se o jednořetězcový polypeptid skládající se z 146 aminokyselin o celkové velikosti 18 kDa (Mor *et al.*, 2018). Na genové úrovni FGF2 ovce vykazuje 100% sekvenční podobnost s FGF2 ze skotu, buvola, prasete, velblouda a koně. Transkript pro FGF2 se nejvíce vyskytoval v nezralých oocytech a po oplození se jeho koncentrace postupně snižovala až do stádia blastocysty. Zdá se, že FGF2 hraje velkou roli při vývoji oocyty a časném embryonálním vývoji u ovce a skotu (Daniels *et al.*, 2000; Mor *et al.*, 2018).

Mezidruhově může docházet k malým rozdílům v kódující sekvenci v genu FGF2, jelikož FGF2 ze skotu nepodpořil kultivaci buvolích oocytů. Předpokládá se, že malá změna v kódující sekvenci může značně ovlivnit vaznost na receptor FGF2R (Kumar *et al.*, 2013).

Pomocí RT-PCR bylo zjištěno, že mRNA pro *FGF2* se vyskytuje v thekálních a granulózních buňkách od stádia antrálního folikulu. Zároveň se zjistilo, že mRNA je také detekovatelná jak v oocyty (Reineri *et al.*, 2018), tak v blastocystách (Wang *et al.*, 2009).

Médium při *in vitro* kultivaci bylo obohaceno o FGF2 a z výsledků je patrné, že došlo ke zlepšení obnovy meiotického dělení a zvýšilo se procento oocytů ve stádiu GVBD. Potlačení apoptózy kumulárních buněk a zároveň jejich náročnější oddělení od oocyty značí kvalitnější extracelulární matrix, která může podpořit vývojové kompetence oocyty. FGF podpořilo kvalitu oocytů při *in vitro* zrání (Barros *et al.*, 2019) a následný vývoj do stádia blastocysty (Fields *et al.*, 2011).

5.3 IGF-1

Inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) je důležitý růstový hormon zprostředkovávající anabolickou a mitogenní aktivitu růstového hormonu. Jedná se o malý peptid složený ze 70 aminokyselin s molekulární hmotností 7,6 kDa. Nejvyšší koncentrace mRNA *IGF-1* byla u skotu detekována v kumulárních buňkách (Nuttinck *et al.*, 2004).

IGF-1 se váže na receptor IGF-1R, což je heterotetramer skládající se ze dvou α a β podjednotek. Podjednotka β obsahuje tyrozin kinázovou doménu, která je schopna receptor autofosforylovat. mRNA kódující receptor IGF-1R byla detekována jak v oocyty, tak v okolních kumulárních buňkách (Singh & Armstrong, 1997; Nuttinck *et al.*, 2004). Během vývoje od nezralého prasečího oocyty až po blastocystu se po celou dobu vyskytovaly transkripty pro IGF-1R. Během zrání množství mRNA kódující IGF-1R klesalo do té doby,

než došlo k aktivaci embryonálního genomu ve stádiu 8-16 buněk. Následně byl pozorován větší nárůst mRNA ve stádiu blastocysty (Yaseen *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005).

Přidáním IGF-1 do kultivačního média se více oocytů dostalo do MII fáze a následně byla po oplodnění zlepšena dělivá schopnost buvolích embryí a více oocytů dozrálo do stádia 8-16 buněk, moruly (Purohit *et al.*, 2005) a stádia blastocysty (Chandra *et al.*, 2012). Některé studie zvýšený počet blastocyst nepotvrzují (Purohit *et al.*, 2005).

IGF-1 u skotu zvýšilo rychlost dělení embrya do stádia 8-16 buněk (Kaya *et al.*, 2017) a následně se zvýšil počet buněk tvořících blastocystu u skotu (Velazquez *et al.*, 2012). Na druhou stranu studie Zaraza *et al.* (2010) pozitivní vliv IGF-1 nepotvrdila.

Přidáním 50 ng/ml IGF-1 se zvýšily vývojové kompetence prasečích oocytů, byla podpořena expanze kumulárních buněk (Singh & Armstrong, 1997) a bylo získáno více blastocyst s větším počtem buněk. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po přidání IGF-1 během prvních 48 hod kultivace nebo pokud se přidávalo během celého průběhu kultivace (Kim *et al.*, 2005).

IGF-1R může dále spouštět signální kaskádu pomocí PI3K, receptoru pro růstový faktor- vazebný protein 2 (Grb2), fosfotyrozín fosfatázu (Syp), onkogenní protein (Nck), Src homologní doména proteinu (Shc), serin threonin protein kinázu B (PKB/AKT), RAF, MAPK a tím regulovat buněčnou odpověď a proliferaci (Laron, 2001; Pavelić *et al.*, 2007).

5.4 LIF

Leukémii bránící faktor (LIF) je glykoproteinový cytokin z rodiny IL-6, který je schopen navodit terminální diferenciaci buněk myeloidní leukemie na buňky makrofágů (Han *et al.*, 1995). mRNA kódující LIF a jeho receptor, skládající se z gp130 a LIFR- β částí, byla detekována v kumulárních buňkách skotu (Eckert, 1998).

Použitím LIF při kultivaci prasečího kumulárně oocytárního komplexu došlo k znatelnému nárůstu oocytů, které se nacházely v MII fázi. Oocyty, kultivované v LIF vykazovaly rychlejší vývoj blastocyst. Zároveň s tím se ukázalo, že jak v kumulárních buňkách, tak v oocyty se nacházejí transkripty pro LIF a jeho receptor a přenašeče signálu STAT3. Podíl fosforylované STAT3 se během kultivace v médiu s LIF značně zvýšil v kumulárních buňkách i v oocyty. Předpokládá se, že LIF během kultivace prasečích oocytů spouští STAT3 signální kaskádu, díky které může dojít ke zlepšení zrání oocyty. Přidáním LIF do kultivačního média se markantně zlepšilo zrání oocytů (Dang-Nguyen *et al.*, 2014).

Přidáním LIF (25 ng/ml) do kultivačního média se u skotu zlepšilo jaderné zrání oocytů jak s kumulárními buňkami, tak i bez nich. Zvýšil se počet oocytů, které se dostaly do MII fáze a také se zlepšilo cytoplazmatické zrání oocyty (Mo *et al.*, 2014). Po kultivaci oocytů s LIF došlo ke zvýšení počtu blastocyt (Neira *et al.*, 2010) s větším počtem buněk. Pomocí western blotu bylo zjištěno, že LIF se podílí na fosforylaci MAPK1/3 a STAT3 (Mo *et al.*, 2014).

Při kultivaci kozích oocytů s LIF a cysteinem bylo procento oocytů v MII fázi nejvyšší, zároveň došlo ke zlepšení oplodnění a rýhování. Samotným přidáním LIF do média se žádný z parametrů nezlepšil, ale následná kvalita blastocyst byla lepší (Ptak *et al.*, 2006; An *et al.*, 2018). Zvýšená kvalita blastocyst mohla být způsobena přidáním cysteinu, který v médiu slouží jako antioxidační činidlo (An *et al.*, 2018). U buvolích oocytů a preimplantačních embryích byla detekována mRNA kódující LIFR, což naznačuje, že LIF hraje významnou roli v dalším vývoji (Eswari *et al.*, 2013).

Na základě studie se nedoporučuje využívat LIF izolovaný z jednoho druhu na kultivaci oocytů druhu dalšího, jelikož zlepšení kultivačních výsledků nebylo pozorováno (Rodríguez *et al.*, 2007).

6 Kultivační médium „FLI“

Vylepšené kultivační médium, ve kterém by byla úspěšnost kultivace oocytů nejvyšší a zároveň s tím, aby se podpořil následný růst blastocyst, je možné sestavit z jichž zmíněných růstových faktorů.

Neira *et al.* (2010) zjistili, že přidáním 50 ng/ml IGF-1, IGF-2, FGF2, TGF- β 1 a GM-CSF od každého faktoru k syntetické tekutině z vejcovodu, dojde ke zlepšení kultivačních podmínek pro oocyty skotu a následně i vývoj blastocyst a embryí.

Přidáním mezenchymálních kmenových buněk do média dochází k produkci řady růstových faktorů (IGF-1, FGF2, LIF, TGF- β a VEGF), které mohou následně podpořit kultivaci oocytů. Kultivační médium pro buvolí oocyty, složené z 50% ze syntetické tekutiny z vejcovodu a z 50% z média obohaceného růstovými faktory mezenchymálních kmenových buněk, zvýšilo počet produkovaných blastocyst a následně i počet embryí při *in vitro* kultivaci (Bhardwaj *et al.*, 2016).

Asistované reprodukční technologie u savců se často potýkají s nedostatečnou kvalitou oocytů, které by mohli být použity k produkci kvalitních embryí. Chemicky definovaným kultivačním médiem „FLI“ obsahujícím IGF-1, FGF2 a LIF, se kultivací prasečích oocytů zlepšilo jaderné zrání oocytů, což umožnilo čtyřnásobně zvýšit efektivitu produkce geneticky modifikovaných prasat (Yuan *et al.*, 2017).

Tab. 1 Složení kultivačního média FLI. Převzato z Yuan *et al.* (2017) a upraveno.

Složka	Zdroj	Kontrolní médium	FLI médium
TCM 199	Gibco, Catalog no. 11150-059	-	-
Glukóza	Sigma, Catalog no. g7021	3.05 mM	3.05 mM
Pyruvát sodný	Sigma, Catalog no. p4562	0.91 mM	0.91 mM
Cystein	Sigma, Catalog no. c7352	0.57 mM	0.57 mM
EGF	Sigma, Catalog no. s4127	10 ng/ml	10 ng/ml
LH	Sigma, Catalog no. L5269	0.5 μ g/ml	0.5 μ g/ml
FSH	Sigma, Catalog no. F2293	10 ng/ml	10 ng/ml
polyvinyl alkohol	Sigma, Catalog no. p8136	0.1 % w/v	0.1 % w/v
lidský LIF	Millipore, Catalog no. LIF1050	0	20 ng/ml
lidský IGF-1	Peptotech, Catalog no. CYT-022	0	20 ng/ml
lidský FGF2	Vlastní zdroj	0	40 ng/ml

Další obměnu média FLI vytvořil Lucas-Hahn *et al.* (2018) přidáním 10 IU hCG, 10 IU/ml PMSG k již zmíněnému médiu. Větší množství kultivovaných prasečích oocytů dospělo do stádia blastocysty. Blastocysty, s větším počtem buněk, daly vzniknout většímu počtu embryí s lepším vývojovým potenciálem.

7 Závěr

Reprodukční trakt je stejně důležitý jako všechny ostatní orgánové soustavy. Fyziologie vaječníků je dokonale přizpůsobena pro uchovávání oocytů ve folikulech. Molekuly produkované oocytem a somatickými buňkami ve folikulu, regulují komplexní signální dráhy zadržující oocyty v profázi I. meiotického dělení. Po dosažení reprodukčního věku, gonadotropiny svým působením iniciují obnovu meiotického dělení oocytů a ovulace v pravidelných intervalech uvolňuje oocyty připravené k oplodnění.

Při asistované reprodukci u hospodářských zvířat nejsou výsledky *in vitro* kultivace oocytů a jejich následného vývoje stále uspokojivé. Obohacením kultivačních médií o růstové hormony a cytokiny se zjistilo, že v adekvátní koncentraci napomáhají kultivaci oocytů a následně zlepšují kvalitu blastocyst. Přidáním kombinace FGF2, LIF a IGF-1 do doposud používaných médií vzniklo tzv. FLI médium. Využitím FLI média se prozatím dosáhlo vysoké úspěšnosti kultivace oocytů a následná kvalita blastocyst byla uspokojivá.

Zdokonalení kultivačních médií pro zrání a fertilizaci oocytů *in vitro* se ukázalo být vhodným nástrojem pro zvýšení efektivity šlechtitelských programů a vyspělých biotechnologických metod, jako jsou klonování či produkce geneticky modifikovaných zvířat. Média zvyšující kvalitu kultivovaných oocytů by po přizpůsobení mohla být využita i při léčbě některých typů neplodnosti (OHSS, PCOS) a při *in vitro* asistované reprodukci v humánní medicíně.

8 Použitá literatura

Citace, v textu bakalářské práce označené hvězdičkou (*), představují sekundární literaturu.

- Adhikari, D. *et al.* (2012) 'Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes', *Human Molecular Genetics*, 21(11), pp. 2476–2484. doi: 10.1093/hmg/ddc061.
- An, L. *et al.* (2018) 'Synergistic effect of cysteamine, leukemia inhibitory factor, and Y27632 on goat oocyte maturation and embryo development in vitro', *Theriogenology*, 108, pp. 56–62. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.028.
- Ascoli, M. *et al.* (2002) 'The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor, A 2002 Perspective', *Endocrine Reviews*, 23(2), pp. 141–174. doi: 10.1210/edrv.23.2.0462.
- Ashkenazi, H. *et al.* (2005) 'Epidermal growth factor family members: Endogenous mediators of the ovulatory response', *Endocrinology*, 146(1), pp. 77–84. doi: 10.1210/en.2004-0588.
- Bächler, M. *et al.* (2014) 'Species-specific differences in follicular antral sizes result from diffusion-based limitations on the thickness of the granulosa cell layer', *Molecular Human Reproduction*, 20(3), pp. 208–221. doi: 10.1093/molehr/gat078.
- Barros, R. G. *et al.* (2019) 'Fibroblast growth factor 2 regulates cumulus differentiation under the control of the oocyte', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 36(5), pp. 905–913. doi: 10.1007/s10815-019-01436-7.
- Baudat, F. *et al.* (2013) 'Meiotic recombination in mammals: Localization and regulation', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 14(11), pp. 794–806. doi: 10.1038/nrg3573.
- Bhardwaj, R. *et al.* (2016) 'Stem Cell Conditioned Media Contains Important Growth Factors and Improves In Vitro Buffalo Embryo Production', *Animal Biotechnology*. 2016, 27(2), pp. 118–125. doi: 10.1080/10495398.2015.1118383.
- Blaha, M. *et al.* (2017) 'Prostaglandin E2 stimulates the expression of cumulus expansion-related genes in pigs: the role of protein kinase B', *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. Elsevier, 130(March), pp. 38–46. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2017.04.001.
- Bornslaeger, E. A. and Schultz, R. M. (1985) 'Regulation of Mouse Oocyte Maturation: Effect of Elevating Cumulus Cell cAMP on Oocyte cAMP Levels1', *Biology of Reproduction*, 33(3), pp. 698–704. doi: 10.1095/biolreprod33.3.698.
- Bukovsky, A. *et al.* (2005) 'Oogenesis in Adult Mammals, Including Humans: A Review', *Endocrine*, 26(3), pp. 301–316. doi: 10.1385/ENDO:26:3:301.
- Buratini, J. *et al.* (2007) 'Expression and Function of Fibroblast Growth Factor 10 and Its Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor 2B, in Bovine Follicles1', *Biology of Reproduction*, 77(4), pp. 743–750. doi: 10.1095/biolreprod.107.062273.
- Caixeta, E. S. *et al.* (2013) 'Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus–oocyte complexes', *REPRODUCTION*, 146(1), pp. 27–35. doi: 10.1530/REP-13-0079.
- Cameron, M. R. *et al.* (1996) 'Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases by Gonadotropins and Cyclic Adenosine 5'-Monophosphates in Porcine Granulosa Cells1', *Biology of Reproduction*, 55(1), pp. 111–119. doi: 10.1095/biolreprod55.1.111.
- Castilho, A. C. S. *et al.* (2014) 'Expression of fibroblast growth factor 10 and cognate receptors in the developing bovine ovary', *Theriogenology*. Elsevier Inc, 81(9), pp. 1268–1274. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.02.008.
- Chandra, V. *et al.* (2012) 'Effect of growth factors (epidermal growth factor , platelet derived growth

- factor , and insulin-like growth factor-1) on buffalo embryos produced in vitro', *Indian Journal of Animal Sciences*, 82(December), pp. 1510–1514.
- Cohen, P. E. *et al.* (2006) 'Genetic Analysis of Chromosome Pairing, Recombination, and Cell Cycle Control during First Meiotic Prophase in Mammals', *Endocrine Reviews*, 27(4), pp. 398–426. doi: 10.1210/er.2005-0017.
- Cole, L. A. (2012) 'hCG, the wonder of today's science', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), p. 24. doi: 10.1186/1477-7827-10-24.
- Conti, M. *et al.* (2006) 'Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles', *Molecular Endocrinology*, 20(4), pp. 715–723. doi: 10.1210/me.2005-0185.
- Conti, M. *et al.* (2012) 'Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation', *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd, 356(1–2), pp. 65–73. doi: 10.1016/j.mce.2011.11.002.
- le Cotonnec, J.-Y. *et al.* (1998) 'Clinical pharmacology of recombinant human luteinizing hormone: Part II. Bioavailability of recombinant human luteinizing hormone assessed with an immunoassay and an in vitro bioassay', *Fertility and Sterility*, 69(2), pp. 195–200. doi: 10.1016/S0015-0282(97)00502-5.
- Dang-Nguyen, T. Q. *et al.* (2014) 'Leukemia inhibitory factor promotes porcine oocyte maturation and is accompanied by activation of signal transducer and activator of transcription 3', *Molecular Reproduction and Development*, 81(3), pp. 230–239. doi: 10.1002/mrd.22289.
- Daniels, R. *et al.* (2000) 'Analysis of Gene Transcription in Bovine Nuclear Transfer Embryos Reconstructed with Granulosa Cell Nuclei', *Biology of Reproduction*, 63(4), pp. 1034–1040. doi: 10.1095/biolreprod63.4.1034.
- Dekel, N. (1988) 'Regulation of Oocyte Maturation.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 541(1 In Vitro Fert), pp. 211–216. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb22258.x.
- DiLuigi, A. *et al.* (2008) 'Meiotic Arrest in Human Oocytes Is Maintained by a Gs Signaling Pathway', *Biology of Reproduction*, 78(4), pp. 667–672. doi: 10.1095/biolreprod.107.066019.
- Diógenes, M. N., Guimarães, A. L. S., Leme, L. O. and Dode, M. A. N. (2017a) 'Bovine in vitro embryo production: the effects of fibroblast growth factor 10 (FGF10)', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(3), pp. 383–390. doi: 10.1007/s10815-016-0852-8.
- Diógenes, M. N., Guimarães, A. L. S., Leme, L. O., Maurício, M. F., *et al.* (2017b) 'Effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on in vitro development of bovine oocytes', *Theriogenology*, 102, pp. 190–198. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.06.004.
- Du, S. *et al.* (2018) 'The expression pattern of fibroblast growth factor 10 and its receptors during buffalo follicular development.', *International journal of clinical and experimental pathology*, 11(10), pp. 4934–4941. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31949569>.
- Duckworth, B. C. *et al.* (2002) 'G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), pp. 16794–16799. doi: 10.1073/pnas.222661299.
- Dufau, M. L. (1998) 'the Luteinizing Hormone Receptor', *Annual Review of Physiology*, 60(1), pp. 461–496. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.461.
- Eckert, J. (1998) 'mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo', *Molecular Human Reproduction*, 4(10), pp. 957–965. doi: 10.1093/molehr/4.10.957.
- Egbert, J. R. *et al.* (2014) 'Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes', *Development*, 141(18), pp. 3594–3604. doi: 10.1242/dev.112219.

- Egbert, J. R. *et al.* (2016) 'Luteinizing Hormone Causes Phosphorylation and Activation of the cGMP Phosphodiesterase PDE5 in Rat Ovarian Follicles, Contributing, Together with PDE1 Activity, to the Resumption of Meiosis1', *Biology of Reproduction*, 94(5), pp. 1–11. doi: 10.1095/biolreprod.115.135897.
- Eswari, S. *et al.* (2013) 'Expression of mRNA encoding leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor (LIFR β) in buffalo preimplantation embryos produced in vitro : markers of successful embryo implantation', *Zygote*, 21(2), pp. 203–213. doi: 10.1017/S0967199412000172.
- Ezcurra, D. and Humaidan, P. (2014) 'A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), p. 95. doi: 10.1186/1477-7827-12-95.
- Fields, S. D. *et al.* (2011) 'Fibroblast growth factor requirements for in vitro development of bovine embryos', *Theriogenology*. Elsevier Inc., 75(8), pp. 1466–1475. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.007.
- Flores, J. A. *et al.* (1998) 'Luteinizing Hormone (LH) Stimulates Both Intracellular Calcium Ion ([Ca²⁺]_i) Mobilization and Transmembrane Cation Influx in Single Ovarian (Granulosa) Cells: Recruitment as a Cellular Mechanism of LH-[Ca²⁺]_i Dose Response*', *Endocrinology*, 139(8), pp. 3606–3612. doi: 10.1210/endo.139.8.6162.
- Freudzon, L. *et al.* (2005) 'Regulation of meiotic prophase arrest in mouse oocytes by GPR3, a constitutive activator of the Gs G protein', *Journal of Cell Biology*, 171(2), pp. 255–265. doi: 10.1083/jcb.200506194.
- Gallo, C. J. *et al.* (1995) 'Stimulation of Xenopus oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes.', *The Journal of Cell Biology*, 130(2), pp. 275–284. doi: 10.1083/jcb.130.2.275.
- Goldsmith, Z. G. and Dhanasekaran, D. N. (2007) 'G Protein regulation of MAPK networks', *Oncogene*, 26(22), pp. 3122–3142. doi: 10.1038/sj.onc.1210407.
- Han, S. J. *et al.* (2005) 'Wee1B Is an Oocyte-Specific Kinase Involved in the Control of Meiotic Arrest in the Mouse', *Current Biology*, 15(18), pp. 1670–1676. doi: 10.1016/j.cub.2005.07.056.
- Han, Y. M. *et al.* (1995) 'Effect of human leukemia inhibitory factor on in vitro development of IVF-derived bovine morulae and blastocysts', *Theriogenology*, 44(4), pp. 507–516. doi: 10.1016/0093-691X(95)00222-T.
- Hillier, S. . (2001) 'Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179(1–2), pp. 39–46. doi: 10.1016/S0303-7207(01)00469-5.
- Hinckley, M. *et al.* (2005) 'The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes', *Developmental Biology*, 287(2), pp. 249–261. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.08.019.
- Holbro, T. and Hynes, N. E. (2004) 'ErbB Receptors: Directing Key Signaling Networks Throughout Life', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1), pp. 195–217. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440.
- Hsieh, M. *et al.* (2011) 'Genetic Dissection of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling during Luteinizing Hormone-Induced Oocyte Maturation', *PLoS ONE*. Edited by J. V. Planas, 6(6), p. e21574. doi: 10.1371/journal.pone.0021574.
- van den Hurk, R. and Zhao, J. (2005) 'Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles', *Theriogenology*, 63(6), pp. 1717–1751. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.005.
- Itahana, K. *et al.* (1996) 'Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-30.3, Cx-32, and Cx-43, in the porcine ovarian follicle.', *Endocrinology*, 137(11), pp. 5036–5044. doi: 10.1210/endo.137.11.8895378.

- Ito, J. *et al.* (2010) 'Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in the maintenance of metaphase II arrest in porcine oocytes matured in vitro', *Animal Science Journal*, 81(1), pp. 42–47. doi: 10.1111/j.1740-0929.2009.00717.x.
- Jaffe, L. A. and Egbert, J. R. (2017) 'Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle', *Annual Review of Physiology*, 79(1), pp. 237–260. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034102.
- Johnson, G. R. *et al.* (1993) 'Characterization of high and low molecular weight forms of amphiregulin that differ in glycosylation and peptide core length. Evidence that the NH₂-terminal region is not critical for bioactivity', *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), pp. 18835–18843.
- Kawamura, K. *et al.* (2011) 'Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes', *Human Reproduction*, 26(11), pp. 3094–3101. doi: 10.1093/humrep/der282.
- Kaya, A. *et al.* (2017) 'Leptin and IGF-I improve bovine embryo quality in vitro', *Animal Reproduction*, 14(4), pp. 1151–1160. doi: 10.21451/1984-3143-AR987.
- Kim, S. *et al.* (2005) 'Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer', *Molecular Reproduction and Development*, 72(1), pp. 88–97. doi: 10.1002/mrd.20327.
- Kostenis, E. (2004) 'Novel clusters of receptors for sphingosine-1-phosphate, sphingosylphosphorylcholine, and (lyso)-phosphatidic acid: New receptors for 'Old' ligands', *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(5), pp. 923–936. doi: 10.1002/jcb.20092.
- Kumar, S. *et al.* (2013) 'Characterization of the coding region of basic fibroblast growth factor (FGF2) c-DNA (open reading frame) in buffalo cumulus cells', *Indian Journal of Animal Sciences*, 83(July), pp. 744–746.
- Laron, Z. (2001) 'Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone', *Molecular Pathology*, 54(5), pp. 311–316. doi: 10.1136/mp.54.5.311.
- Li, Q. *et al.* (2009) 'Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: Gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process', *Reproduction*, 137(2), pp. 297–307. doi: 10.1530/REP-08-0308.
- Liu, X. *et al.* (2014) 'Multiple Pathways Mediate Luteinizing Hormone Regulation of cGMP Signaling in the Mouse Ovarian Follicle', *Biology of Reproduction*, 91(1), pp. 1–11. doi: 10.1095/biolreprod.113.116814.
- Liu, Z. *et al.* (2010) 'Targeted Disruption of Mapk14 (p38MAPK α) in Granulosa Cells and Cumulus Cells Causes Cell-Specific Changes in Gene Expression Profiles that Rescue COC Expansion and Maintain Fertility', *Molecular Endocrinology*, 24(9), pp. 1794–1804. doi: 10.1210/me.2010-0086.
- Lucas-Hahn, A. *et al.* (2018) '122 A New Maturation Medium Improves Porcine Embryo Production In Vitro', *Reproduction, Fertility and Development*, 30(1), p. 200. doi: 10.1071/RDv30n1Ab122.
- Luciano, A. M. *et al.* (2004) 'Role of Intracellular Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Concentration and Oocyte-Cumulus Cells Communications on the Acquisition of the Developmental Competence During In Vitro Maturation of Bovine Oocyte', *Biology of Reproduction*, 70(2), pp. 465–472. doi: 10.1095/biolreprod.103.020644.
- Lyga, S. *et al.* (2016) 'Persistent cAMP Signaling by Internalized LH Receptors in Ovarian Follicles', *Endocrinology*, 2016(1), pp. 63–71. doi: 10.1210/en.2015-1945.
- Masciarelli, S. *et al.* (2004) 'Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility', *Journal of Clinical Investigation*, 114(2), pp. 196–205. doi: 10.1172/JCI21804.
- Mehlmann, L. M. (2002) 'Meiotic Arrest in the Mouse Follicle Maintained by a Gs Protein in the Oocyte', *Science*, 297(5585), pp. 1343–1345. doi: 10.1126/science.1073978.

- Mehlmann, L. M. (2004) 'The Gs-Linked Receptor GPR3 Maintains Meiotic Arrest in Mammalian Oocytes', *Science*, 306(5703), pp. 1947–1950. doi: 10.1126/science.1103974.
- Mehlmann, L. M. (2005) 'Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes', *Developmental Biology*, 288(2), pp. 397–404. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.030.
- Mo, X. *et al.* (2014) 'Leukemia inhibitory factor enhances bovine oocyte maturation and early embryo development', *Molecular Reproduction and Development*, 81(7), pp. 608–618. doi: 10.1002/mrd.22327.
- Mor, A. *et al.* (2018) 'Molecular cloning and expression of FGF2 gene in pre-implantation developmental stages of in vitro-produced sheep embryos', *Reproduction in Domestic Animals*, 53(4), pp. 895–903. doi: 10.1111/rda.13182.
- Neira, J. A. *et al.* (2010) 'Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- β 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro', *Theriogenology*, 73(5), pp. 595–604. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.015.
- Norris, R. P. *et al.* (2008) 'Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption', *Development*, 135(19), pp. 3229–3238. doi: 10.1242/dev.025494.
- Norris, R. P. *et al.* (2009) 'Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte', *Development*, 136(11), pp. 1869–1878. doi: 10.1242/dev.035238.
- Norris, R. P. *et al.* (2010) 'Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH', *Reproduction*, 140(5), pp. 655–662. doi: 10.1530/REP-10-0288.
- Nuttinck, F. *et al.* (2004) 'Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus–oocyte complexes during oocyte maturation', *Domestic Animal Endocrinology*, 27(2), pp. 179–195. doi: 10.1016/j.domaniend.2004.03.003.
- Palermo, R. (2007) 'Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis', *Reproductive BioMedicine Online*, 15(3), pp. 326–337. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60347-1.
- Pan, Y. *et al.* (2019) 'FGF10 enhances yak oocyte fertilization competence and subsequent blastocyst quality and regulates the levels of CD9, CD81, DNMT1, and DNMT3B', *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), pp. 17677–17689. doi: 10.1002/jcp.28394.
- Panigone, S. *et al.* (2008) 'Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway', *Molecular Endocrinology*, 22(4), pp. 924–936. doi: 10.1210/me.2007-0246.
- Park, J. Y. *et al.* (2004) 'EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle', *Science*, 303(5658), pp. 682–684. doi: 10.1126/science.1092463.
- Park, M. R. *et al.* (2011) 'Possible involvement of Class III phosphatidylinositol-3-kinase in meiotic progression of porcine oocytes beyond germinal vesicle stage', *Theriogenology*. Elsevier Inc., 75(5), pp. 940–950. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.002.
- Pavelić, J. *et al.* (2007) 'Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family', *Indian Journal of Medical Research*, 125(4), pp. 511–522.
- Pepling, M. E. (2006) 'From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development', *genesis*, 44(12), pp. 622–632. doi: 10.1002/dvg.20258.
- Pincus, G. and Enzmann, E. V. (1936) 'The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. II. The activation of tubal eggs of the rabbit', *Journal of Experimental Zoology*, 73(2), pp. 195–208. doi: 10.1002/jez.1400730202.
- Pirino, G. *et al.* (2009) 'Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes', *Cell Cycle*, 8(4), pp. 665–670. doi: 10.4161/cc.8.4.7846.

- Pirino, G., Wescott, M. P. and Donovan, P. J. (2009) 'Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes', *Cell Cycle*, 8(4), pp. 665–670. doi: 10.4161/cc.8.4.7846.
- Potter, L. R. *et al.* (2009) 'Natriuretic Peptides: Their Structures, Receptors, Physiologic Functions and Therapeutic Applications', in Schmidt, H. H. H. W., Hofmann, F., and Stasch, J.-P. (eds). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Handbook of Experimental Pharmacology), pp. 341–366. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_15.
- Potter, L. R. (2011) 'Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier B.V., 130(1), pp. 71–82. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.12.005.
- Prochazka, R. *et al.* (2003) 'Epidermal Growth Factor-Receptor Tyrosine Kinase Activity Regulates Expansion of Porcine Oocyte-Cumulus Cell Complexes In Vitro¹', *Biology of Reproduction*, 68(3), pp. 797–803. doi: 10.1095/biolreprod.102.005520.
- Prochazka, R. *et al.* (2012) 'Signaling pathways regulating FSH-and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig', *Reproduction*, 144(5), pp. 535–546. doi: 10.1530/REP-12-0191.
- Procházka, R. *et al.* (2000) 'Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: Nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling', *Molecular Reproduction and Development*, 56(1), pp. 63–73. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200005)56:1<63::AID-MRD8>3.0.CO;2-D.
- Prochazka, R. and Nemcova, L. (2019) 'Mechanisms of FSH- and Amphiregulin-Induced MAP Kinase 3/1 Activation in Pig Cumulus-Oocyte Complexes During Maturation In Vitro', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), p. 1179. doi: 10.3390/ijms20051179.
- Ptak, G. *et al.* (2006) 'Leukaemia inhibitory factor enhances sheep fertilization in vitro via an influence on the oocyte', *Theriogenology*, 65(9), pp. 1891–1899. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.10.018.
- Purohit, G. N. *et al.* (2005) 'Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro', *Animal Reproduction Science*, 87(3–4), pp. 229–239. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.09.009.
- Reineri, P. S. *et al.* (2018) 'Gene expression of growth factor BMP15, GDF9, FGF2 and their receptors in bovine follicular cells', *Revista MVZ Córdoba*, 23(3), pp. 6778–6787. doi: 10.21897/rmvz.1367.
- Richard, S. and Baltz, J. M. (2014) 'Prophase I Arrest of Mouse Oocytes Mediated by Natriuretic Peptide Precursor C Requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) Gap Junctions in the Antral Follicle and Cumulus-Oocyte Complex¹', *Biology of Reproduction*, 90(6), pp. 1–10. doi: 10.1095/biolreprod.114.118505.
- Riese, D. J. *et al.* (1998) 'Activation of ErbB4 by the bifunctional epidermal growth factor family hormone epiregulin is regulated by ErbB2', *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), pp. 11288–11294. doi: 10.1074/jbc.273.18.11288.
- Rimon-Dahari, N. *et al.* (2016) 'Ovarian Folliculogenesis', in, pp. 167–190. doi: 10.1007/978-3-319-31973-5_7.
- Robinson, J. W. *et al.* (2012) 'Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes', *Developmental Biology*. Elsevier, 366(2), pp. 308–316. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.04.019.
- Rodríguez, A. *et al.* (2007) 'Effects of human versus mouse leukemia inhibitory factor on the in vitro development of bovine embryos', *Theriogenology*, 67(5), pp. 1092–1095. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.11.015.
- Ruddock, N. T. *et al.* (2001) 'Porcine oocyte activation: Differing roles of calcium and pH', *Molecular*

- Reproduction and Development*, 59(2), pp. 227–234. doi: 10.1002/mrd.1027.
- Sanderson, M. P., Dempsey, P. J. and Dunbar, A. J. (2006) ‘Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors.’, *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 24(2), pp. 121–136. doi: 10.1080/08977190600634373.
- Sarma, U. C. *et al.* (2019) ‘Oocytes from stem cells’, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. Elsevier Ltd, 55, pp. 14–22. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.07.006.
- Sayasith, K. *et al.* (2013) ‘Human chorionic gonadotropin-dependent up-regulation of epiregulin and amphiregulin in equine and bovine follicles during the ovulatory process’, *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier Inc., 180(1), pp. 39–47. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.10.012.
- Segaloff, D. L. and Ascoli, M. (1993) ‘The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor... 4 Years Later*’, *Endocrine Reviews*, 14(3), pp. 324–347. doi: 10.1210/edrv-14-3-324.
- Sela-Abramovich, S. *et al.* (2005) ‘Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles’, *Endocrinology*, 146(3), pp. 1236–1244. doi: 10.1210/en.2004-1006.
- Shimada, M. *et al.* (2001) ‘Dynamic Changes of Connexin-43, Gap Junctional Protein, in Outer Layers of Cumulus Cells Are Regulated by PKC and PI 3-Kinase During Meiotic Resumption in Porcine Oocytes’, *Biology of Reproduction*, 64(4), pp. 1255–1263. doi: 10.1095/biolreprod64.4.1255.
- Shimada, M. *et al.* (2003) ‘Luteinizing Hormone Receptor Formation in Cumulus Cells Surrounding Porcine Oocytes and Its Role During Meiotic Maturation of Porcine Oocytes1’, *Biology of Reproduction*, 68(4), pp. 1142–1149. doi: 10.1095/biolreprod.102.010082.
- Shimada, M. and Terada, T. (2002) ‘Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34cdc2 kinase activity during meiotic progression, especially beyond the MI stage’, *Molecular Reproduction and Development*, 62(1), pp. 124–131. doi: 10.1002/mrd.10075.
- Shing, Y. *et al.* (1993) ‘Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors’, *Science*, 259(5101), pp. 1604 LP – 1607. doi: 10.1126/science.8456283.
- Shoyab, M. *et al.* (1989) ‘Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family’, *Science*, 243(4894), pp. 1074–1076. doi: 10.1126/science.2466334.
- Shuhaibar, L. C. *et al.* (2015) ‘Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles’, 112(17). doi: 10.1073/pnas.1423598112.
- Shuhaibar, L. C. *et al.* (2016) ‘Dephosphorylation of juxtamembrane serines and threonines of the NPR2 guanylyl cyclase is required for rapid resumption of oocyte meiosis in response to luteinizing hormone’, *Developmental Biology*. Elsevier, 409(1), pp. 194–201. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.10.025.
- Simon, A. M. *et al.* (1997) ‘Female infertility in mice lacking connexin 37’, *Nature*, 385(6616), pp. 525–529. doi: 10.1038/385525a0.
- Singh, B. and Armstrong, D. T. (1997) ‘Insulin-Like Growth Factor-1, a Component of Serum that Enables Porcine Cumulus Cells to Expand in Response to Follicle-Stimulating Hormone in Vitro1’, *Biology of Reproduction*, 56(6), pp. 1370–1375. doi: 10.1095/biolreprod56.6.1370.
- Son, Y. *et al.* (2017) ‘Fibroblast growth factor 10 markedly improves in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes’, *Molecular Reproduction and Development*, 84(1), pp. 67–75. doi: 10.1002/mrd.22756.
- de Souza, D. K. *et al.* (2018) ‘Effects of PI3K and FSH on steroidogenesis, viability and embryo development of the cumulus–oocyte complex after in vitro culture’, *Zygote*, 26(1), pp. 50–61. doi: 10.1017/S0967199417000703.
- Su, Y.-Q. *et al.* (1999) ‘Protein kinase C and intracellular calcium are involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes in hypoxanthine-supplemented medium’, *Molecular Reproduction and Development*, 53(1), pp. 51–58. doi:

- 10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<51::AID-MRD6>3.0.CO;2-4.
- Su, Y. Q. *et al.* (2002) 'Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse', *Endocrinology*, 143(6), pp. 2221–2232. doi: 10.1210/en.143.6.2221.
- Su, Y. Q. *et al.* (2003) 'Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex', *Developmental Biology*, 263(1), pp. 126–138. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00437-8.
- Theofanakis, C. *et al.* (2017) 'Human Chorionic Gonadotropin: The Pregnancy Hormone and More', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), p. 1059. doi: 10.3390/ijms18051059.
- Toyoda, H. *et al.* (1995) 'Epiregulin', *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), pp. 7495–7500. doi: 10.1074/jbc.270.13.7495.
- Tribulo, P. *et al.* (2018) 'Identification of potential embryokines in the bovine reproductive tract', *Journal of Dairy Science*. American Dairy Science Association, 101(1), pp. 690–704. doi: 10.3168/jds.2017-13221.
- Tsafiriri, A. *et al.* (1972) 'In-vitro induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E 2 .', *Journal of reproduction and fertility*, 31(1), pp. 39–50. doi: 10.1530/jrf.0.0310039.
- Vaccari, S. *et al.* (2009) 'Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes1', *Biology of Reproduction*, 81(3), pp. 595–604. doi: 10.1095/biolreprod.109.077768.
- Veitch, G. I. (2004) 'Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface', *Journal of Cell Science*, 117(13), pp. 2699–2707. doi: 10.1242/jcs.01124.
- Velazquez, M. A. *et al.* (2012) 'In vivo oocyte IGF-1 priming increases inner cell mass proliferation of in vitro-formed bovine blastocysts', *Theriogenology*. Elsevier Inc., 78(3), pp. 517–527. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.034.
- Verlhac, M.-H. (2000) 'Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways', *The EMBO Journal*, 19(22), pp. 6065–6074. doi: 10.1093/emboj/19.22.6065.
- Wang, W.-H. *et al.* (1999) 'Activation of porcine oocytes with calcium ionophore: Effects of extracellular calcium', *Molecular Reproduction and Development*, 53(1), pp. 99–107. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<99::AID-MRD12>3.0.CO;2-G.
- Wang, X. *et al.* (2009) 'Analysis of segregation distortion and association of the bovine FGF2 with fertilization rate and early embryonic survival', *Animal Genetics*, 40(5), pp. 722–728. doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01904.x.
- Wang, Y. *et al.* (2013) 'Epidermal Growth Factor Receptor Signaling-Dependent Calcium Elevation in Cumulus Cells Is Required for NPR2 Inhibition and Meiotic Resumption in Mouse Oocytes', *Endocrinology*, 154(9), pp. 3401–3409. doi: 10.1210/en.2013-1133.
- Wayne, C. M. *et al.* (2007) 'Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: Evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation', *Molecular Endocrinology*, 21(8), pp. 1940–1957. doi: 10.1210/me.2007-0020.
- Webb, R. *et al.* (2002a) 'Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation', *Reproduction*, 123(1), pp. 41–52. doi: 10.1530/rep.0.1230041.
- Webb, R. J. *et al.* (2002b) 'Follicle-Stimulating Hormone Induces a Gap Junction-Dependent Dynamic Change in [cAMP] and Protein Kinase A in Mammalian Oocytes', *Developmental Biology*, 246(2), pp. 441–454. doi: 10.1006/dbio.2002.0630.

- Wu, H. *et al.* (1994) 'Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein', *Structure*, 2(6), pp. 545–558. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00054-X.
- Wu, J. *et al.* (2007) 'Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown in vitro', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(9), pp. 419–424. doi: 10.1007/s10815-007-9154-5.
- Xi, G. *et al.* (2018) 'Natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) localized in bovine oocyte underlies a unique mechanism for C-type natriuretic peptide (CNP)-induced meiotic arrest', *Theriogenology*. Elsevier Ltd, 106, pp. 198–209. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.09.003.
- Yamashita, Y. *et al.* (2007) 'Hormone-Induced Expression of Tumor Necrosis Factor α -Converting Enzyme/A Disintegrin and Metalloprotease-17 Impacts Porcine Cumulus Cell Oocyte Complex Expansion and Meiotic Maturation via Ligand Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor', *Endocrinology*, 148(12), pp. 6164–6175. doi: 10.1210/en.2007-0195.
- Yamashita, Y. *et al.* (2009) 'Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs', *Journal of Ovarian Research*, 2(1), p. 20. doi: 10.1186/1757-2215-2-20.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) 'Untangling the ErbB signalling network', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), pp. 127–137. doi: 10.1038/35052073.
- Yaseen, M. *et al.* (2001) 'Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems', *Reproduction*, 122(4), pp. 601–610. doi: 10.1530/rep.0.1220601.
- Yen, S. S. C. *et al.* (1968) 'Disappearance Rates of Endogenous Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin in Man', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(12), pp. 1763–1767. doi: 10.1210/jcem-28-12-1763.
- Yuan, Y. *et al.* (2017) 'Quadrupling efficiency in production of genetically modified pigs through improved oocyte maturation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), pp. E5796–E5804. doi: 10.1073/pnas.1703998114.
- Zamah, A. M. *et al.* (2010) 'Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin†', *Human Reproduction*, 25(10), pp. 2569–2578. doi: 10.1093/humrep/deq212.
- Zaraza, J. *et al.* (2010) 'Developmental competence and mRNA expression of preimplantation in vitro-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1', *Theriogenology*. Elsevier Inc., 74(1), pp. 75–89. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.033.
- Zhang, K. *et al.* (2010) 'Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro', *REPRODUCTION*, 140(6), pp. 815–826. doi: 10.1530/REP-10-0190.
- Zhang, M. *et al.* (2010) 'Granulosa Cell Ligand NPPC and Its Receptor NPR2 Maintain Meiotic Arrest in Mouse Oocytes', *Science*, 330(6002), pp. 366–369. doi: 10.1126/science.1193573.
- Zhang, W. *et al.* (2014) 'Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption', *Molecular Reproduction and Development*, 81(11), pp. 1030–1041. doi: 10.1002/mrd.22424.
- Zhang, W. *et al.* (2015) 'Brain Natriuretic Peptide and C-Type Natriuretic Peptide Maintain Porcine Oocyte Meiotic Arrest', *Journal of Cellular Physiology*, 230(1), pp. 71–81. doi: 10.1002/jcp.24682.
- Zhang, Y. *et al.* (2017) 'Natriuretic peptides improve the developmental competence of in vitro cultured porcine oocytes', *Reproductive Biology and Endocrinology*. Reproductive Biology and

Endocrinology, 15(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12958-017-0258-1.

Zhao, M. and Dean, J. (2002) ‘The zona pellucida in folliculogenesis, fertilization and early development’, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 3(1), pp. 19–26. doi: 10.1023/a:1012744617241.